

N° D'ORDRE
1308

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS.

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

Par Ch. HERVIEUX

Chef de service de Chimie à l'Ecole nationale vétérinaire de Lyon.
Ancien élève à l'Ecole spéciale militaire de Saint-Cyr.

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR L'INDOL ET L'ACIDE GLYCURONIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 29 Juin 1908, devant la Commission d'examen.

MM. BOUTY, *Président*.

DASTRE,

BOUVEAULT,

G. BERTRAND,

} *Examineurs.*

LYON

IMPRIMERIES RÉUNIES

8, RUE RACHAIS, 8

1908

N^o D'ORDRE
1308

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

Par Ch. HERVIEUX

Chef de service de Chimie à l'Ecole nationale vétérinaire de Lyon,
Ancien élève à l'Ecole spéciale militaire de Saint-Cyr.

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR L'INDOL ET L'ACIDE GLYCURONIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 29 Juin 1908, devant la Commission d'examen.

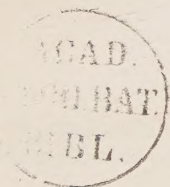
MM. BOUTY, *Président*.

DASTRE,

BOUVEAULT.

G. BERTRAND,

} *Examineurs.*



LYON

IMPRIMERIES RÉUNIES

8, RUE RACHAIS, 8

1908

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.	
DOYEN	P. APPELL, <i>Professeur</i>	Mécanique rationnelle.
DOYEN HONORAIRE.....	G. DARBOUX, —	Géométrie supérieure.
PROFESSEURS HONORAIRES.	{ L. TROOST. Ch. WOLF. J. RIBAN.	
	LIPPMANN.....	Physique.
	BOUTY	Physique.
	BOUSSINESQ.....	Physique mathém. et calcul des probabilités.
	PICARD.....	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ.....	Astronomie mathém. et mécanique céleste.
	Y. DELAGE.....	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	G. BONNIER.....	Botanique.
	DASTRE.....	Physiologie.
	DITTE.....	Chimie.
	GIARD	Zoologie, Évolution des êtres organisés.
	KOENIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
	GOURSAT.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
PROFESSEURS	{ CHATIN	Histologie.
	PELLAT.....	Physique.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET.....	Physique —
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER	Astronomie physique.
	PAINLEVÉ.....	Mathématiques générales.
	HAUG	Géologie.
	TANNERY	Calcul différentiel et calcul intégral.
	RAFFY	Application de l'analyse à la géométrie.
	HOUSSAY.....	Zoologie.
	H. LE CHATELIER....	Chimie.
	N.....	Chimie biologique.
	N.....	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	N.....	Physique.
	PUISEUX	Mécanique et astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	HADAMARD.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
PROFESSEURS ADJOINTS...	{ MATRUCHOT.....	Botanique.
	MICHEL	Minéralogie.
	DAGUILLON.....	Botanique.
	BOUVEAULT.....	Chimie organique.
	BOREL	Théorie des fonctions.
	G. PRUVOT.....	Anatomie comparée.
	CAULLERY	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
SECRÉTAIRE.....	A. GUILLET.	

A MON MAITRE ET AMI,

MONSIEUR LE PROFESSEUR Ch. PORCHER

DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Je dédie ce travail.

C. H.

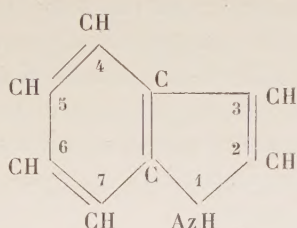


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554031_0067

INTRODUCTION

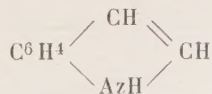
L'indol est un composé que l'on doit considérer au point de vue chimique comme résultant de l'accolement du noyau benzène et du noyau pyrrol selon le schéma qui suit :



c'est en somme un phéno-pyrrol :

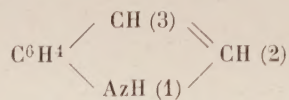
L'indol peut donner des dérivés par substitution, celle-ci pouvant être effectuée, soit dans le noyau benzène, soit dans le noyau pyrrol.

Nous ne considérons ici que les substitutions portant sur le noyau pyrrol, et dans ces conditions il devient plus simple d'écrire la formule de l'indol de la façon suivante :

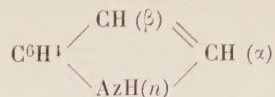


La désignation des sommets libres du noyau pyrrol est néces-

saire pour caractériser la place des substitutions. On utilise dans ce cas le numérotage



ou les premières lettres grecques α et β , le sommet azoté portant la lettre n



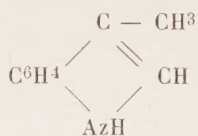
Le sujet de notre travail porte — son titre l'indique — principalement sur l'indol, son origine et son devenir dans l'économie animale et sur les chromogènes qui en dérivent. Mais nous croyons bon de dresser tout d'abord la liste des composés chimiques voisins qui, ayant avec lui des rapports plus ou moins étroits, ont fait au laboratoire l'objet de recherches expérimentales entreprises, soit par M. Porcher, soit par nous-même.

Nous aurons, en effet, au cours de ce travail, l'occasion d'établir quelquefois entre l'indol et ces composés des relations utiles pour la compréhension de certains faits expérimentaux.

Ces composés peuvent se ranger sous deux chefs différents :

- 1° Les dérivés non oxygénés ;
- 2° Les dérivés oxygénés ;

Dérivés non oxygénés. — 1° Nous trouvons d'abord le scatol (1, 2, 3) ou méthylindol 3 ou β :

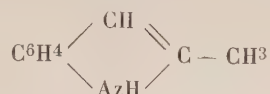


(1) PORCHER et HERVIEUX. Sur le chromogène urinaire dû aux injections sous-cutanées de scatol. *C. R. Acad. Sc.*, 27 juin 1904.

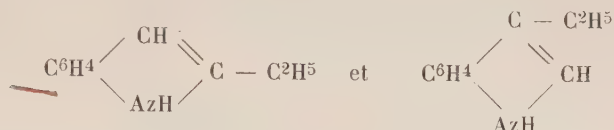
(2) PORCHER et HERVIEUX. Untersuchungen uber das Skatol. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 45, 486, 1905.

(3) PORCHER et HERVIEUX. Recherches expérimentales sur les chromogènes urinaires du groupe de l'indol. Expériences avec le scatol, 3° et 4° mémoires. *Journ. de physiol. et pathol. gén.*, p. 787 et 812, 1905.

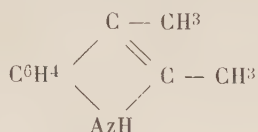
2° Et son isomère : le méthylcétol ou méthylindol 2 ou α (4) :



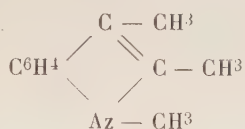
3° Les éthylindols en 2 ou α et en 3 ou β (5) :



4° Le diméthylindol 2.3 (6) :

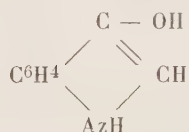


5° Le triméthylindol 1.2.3. (6) :



Dérivés oxygénés. — Nous avons expérimenté sur :

1° L'indoxyle (6, 7) :



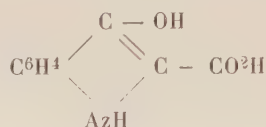
(4) PORCHER et HERVIEUX. Sur le chromogène urinaire que produit l'administration du méthylcétol chez les animaux. *C. R. Soc. Biol.*, 31 mars 1906, p. 607.

(5) PORCHER. Du chromogène urinaire faisant suite à l'administration d'éthylindol chez les animaux. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 994, 1907.

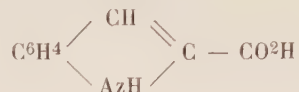
(6) HERVIEUX. Recherches expérimentales d'ordre urologique sur quelques composés du groupe de l'indol. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 996, 1907.

(7) PORCHER et HERVIEUX. Recherches expérimentales sur les chromogènes urinaires du groupe de l'indol, 5^e mémoire. De l'indigurie. *Journ. de physiol. et pathol. gén.*, n° 5, 841, sept. 1906.

2° L'acide indoxylcarbonique ou indoxyliqué (6) :



3° L'acide indolcarbonique 2 ou α (8) :



Entre tous ces dérivés de l'indol, un seul présente un intérêt réel en chimie physiologique, c'est le scatol.

Le scatol a été trouvé par BRIEGER (9) dans les excréments humains; il prend naissance dans les mêmes conditions que l'indol et à côté de lui, mais non dans les mêmes proportions.

Si au point de vue chimique il possède des propriétés voisines de celles de l'indol, au point de vue physiologique il se comporte tout différemment lorsqu'il est introduit dans l'organisme des animaux (3).

(8) PORCHER et HERVIEUX. Du chromogène urinaire faisant suite à l'administration d'acide indolcarbonique. *C. R. Acad. Sc.*, 27 juillet 1907.

(9) BRIEGER. Ueber die flüchtigen Bestandtheile der menschlichen Excrementen. *Berichte*, 10, 1029, 1877.

DE L'INDOL

Propriétés physiques.

L'indol est un corps solide, cristallisé en lamelles incolores, brillantes, d'une odeur fécaloïde très pénétrante. Toutefois, ce corps à l'état de traces infinitésimales est plutôt odorant, et l'on comprend alors très bien pourquoi l'indol synthétique a pu avoir un grand débouché dans la parfumerie. Nous rappellerons ici que l'essence naturelle de jasmin renferme 2,5 % d'indol (10, 11, 12).

L'indol fond à 52° et bout, sous la pression ordinaire, à 254° en se décomposant partiellement. Il est volatil et très facilement entraînable dans un courant de vapeur d'eau. L'eau en dissout très peu, un peu plus à chaud qu'à froid. Il est très facilement soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, le benzène et la ligroïne; ces deux derniers dissolvants l'enlèvent par simple agitation à ses solutions aqueuses.

Il est inactif sur la lumière polarisée; sa molécule ne possède d'ailleurs pas de carbone asymétrique.

Sa densité de vapeur prise par la méthode d'HOFFMANN dans le naphthalène bouillant est de 4,4 (NENCKI); la théorie, en admettant la formule C^8H^7Az , réclamerait 4,05 (13).

(10) HESS et MÜLLER. Ueber aetherisches Jasminbluthenöl. *Berichte*, **32**, 565, 1900.

(11) HESS. Ueber aetherisches Jasminbluthenöl. *Berichte*, **32**, 760, 1900.

(12) HESS. Ueber aetherisches Jasminbluthenöl. *Berichte*, **32**, 2611, 1900.

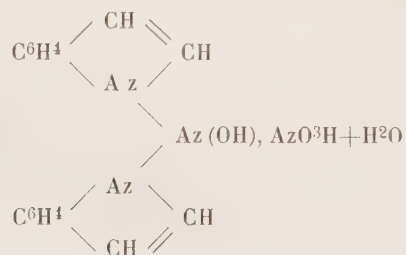
(13) NENCKI. Ueber die Dampfdichte des Indols. *Berichte*, **6**, 1517, 1874.

Propriétés chimiques.

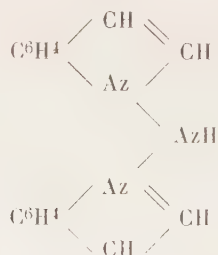
Au point de vue chimique, l'indol se comporte comme une base faible, ce qu'explique sa fonction amine secondaire ($= \text{AzH}$). Il se combine avec les acides minéraux forts; sa combinaison chlorhydrique est difficilement soluble dans l'eau et est décomposée par celle-ci à l'ébullition.

Par addition de quelques gouttes d'acide azotique et de nitrite de sodium ou encore d'acide azotique chargé de vapeurs nitreuses, à une solution aqueuse d'indol, il se précipite un corps rouge, le *nitrate de nitrosoindol*, que les acides résinifient facilement (13).

NENCKI (13) donne à ce composé la formule suivante :



Sa réduction à l'aide du sulfure d'ammonium en solution alcoolique fournit l'*hydroazoindol* :



Si on chauffe dans un tube à essais 0 gr. 5 d'acide oxalique avec une trace d'indol, on obtient un sublimat et un produit de fusion

possédant tous deux une magnifique coloration rouge pourpre qui se conserve en liqueur aqueuse et n'est pas modifiée par les lessives alcalines (14).

Le scatol se comporte sensiblement de la même façon. Avec l'acide phtalique on obtiendrait un sublimat légèrement violacé.

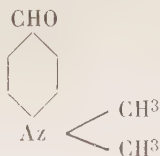
Les acides malonique et succinique donnent avec l'indol, toujours dans les mêmes conditions, des produits faiblement colorés en rouge, mais la couleur s'accroît avec les homologues de l'indol. L'isatine en solution sulfurique donne avec l'indol une couleur rouge cramoisi. Avec une solution sulfurique d'alloxane, on obtient une coloration vert émeraude (15).

Nous n'insisterons pas sur ces réactions, car nous préférons porter notre attention sur celles qui, en chimie physiologique, nous permettront de déceler facilement et sûrement l'indol. Elles sont de deux sortes :

- 1° Celles qui aboutissent à la formation d'une coloration généralement très marquée ;
- 2° Celles qui conduisent à l'obtention d'un précipité.

1° RÉACTION DE COLORATION AVEC LA PARADIMÉTHYLAMINO-BENZALDÉHYDE.

La p. diméthylamino-benzaldéhyde



fut préconisée par EHRLICH pour rechercher l'indol dans les

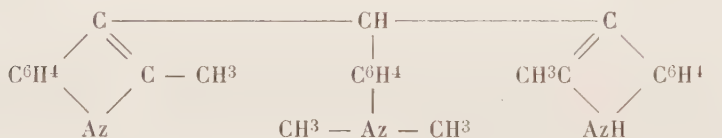
(14) GNEZDA. Sur des réactions nouvelles des bases indoliques et des corps albuminoïdes. *C. R. Acad. Sc.*, **128**, 1584, 1899.

(15) CIAMICIAN et ZATTI. Ueber einige Derivate des Indols. *Berichte*, **22**, 1376, 1889.

bouillons de culture, puis par SCHMIDT (16) et BAUMSTARK (17) pour le déceler dans les fèces.

A 10 cc. de la solution indolique, on ajoute 1 cc. d'une solution alcoolique de p. diméthylamino-benzaldéhyde (p. diméthylamino : 1 gr. ; alcool à 95° : 20 cc.) ; on agite le mélange. Si l'on s'est servi d'une solution aqueuse d'indol, il se produit un trouble blanchâtre qui ne gêne nullement. Puis, dans le fond du tube, on fait arriver lentement, au moyen d'une pipette effilée, de l'acide chlorhydrique fort ; à la surface de séparation des deux liquides apparaît alors un anneau rouge intense, qui va s'estompant vers le haut comme vers le bas.

Lorsque les solutions indoliques sont concentrées, il se produit même un précipité rouge cramoisi, jouissant d'un grand pouvoir tinctorial. Il s'agit là d'un produit de condensation qui, au point de vue chimique, n'a pas été étudié spécialement pour l'indol, mais bien pour le méthylcétol par MM. FISCHER (18), FREUND et LEBACH (19). La formule assignée par ces auteurs, au produit dérivé du méthylcétol, est la suivante :



Cette réaction est extrêmement sensible : au 1/10.000.000, d'après GORTER (20) ; c'est même la plus sensible de l'indol, elle permet de déceler des traces de ce corps et peut servir au dosage colorimétrique de ce dernier. Quand on utilise des solutions pures, la couleur rouge est soluble dans l'alcool amylique qui l'enlève

(16) SCHMIDT. Ueber den Nachweiss und die Bestimmung des Indols in den Fäzes mittelst der Ehrlich'schen Dimethylamidobenzaldehydreaktion. *Münch. medic. Wochenschr.*, n° 17, 1903.

(17) BAUMSTARK. Bestimmung der Fäulnisprodukte im Urin und in den Fäzes mit Benützung der Ehrlichen Aldehydreaktion. *Münch. medic. Wochenschr.*, n° 17, 1903.

(18) FISCHER. Ueber das Methylketol. *Annal. der Chem.*, **242**, 372, 1887.

(19) FREUND et LEBACH. Ueber Indolfarbstoff. *Berichte*, **36**, 308, 1903.

(20) GORTER et DE GRAAFF. Sur la réaction de Herter et Foster. *C. R. Soc. Biol.*, 7 mars 1908.

facilement, par quelques agitations douces, à sa solution aqueuse.

Le réactif d'EHRLICH ne doit pas être utilisé sans précautions préalables, avec des liqueurs physiologiques renfermant, soit de l'albumine, soit des chromogènes indoxyliques, pour les raisons suivantes :

1° Les liquides albumineux, contenant de l'albumine du sang ou encore de la caséine, donnent une coloration ou bleue ou rouge qui peut gêner la perception de la couleur rouge attribuable à l'indol ;

2° Les chromogènes indoxyliques sont aisément décomposés par l'acide chlorhydrique fort, avec formation consécutive de couleurs indigotiques bleues ou rouge violacé.

Il est donc indiqué de séparer l'indol du liquide physiologique qui le contient par un entraînement à la vapeur d'eau après alcalinisation.

Nous avons constaté — l'explication nous en échappe — que la solution alcoolique récente de p. diméthylamino-benzaldéhyde ne donne pas de colorations aussi nettes qu'une solution déjà vieille (21).

Si, et nous tenons à le répéter, la réaction que fournit l'indol avec le p. diméthylamino-benzaldéhyde dans les conditions que nous venons de préciser est des plus sensibles, par contre, elle n'est pas spécifique de ce corps. Elle a lieu également avec ses homologues, voire même avec le pyrrol.

Il est vrai que la couleur formée n'est pas toujours identique à celle que donne l'indol ; mais on aurait tort de trop tenir compte de ces différences purement objectives de teintes pour établir de sérieuses distinctions entre les corps qui les fournissent, car lorsqu'on a affaire, ce qui arrive souvent, à un mélange d'indol et de scatol, on obtient évidemment un anneau coloré qui ne possède plus la belle couleur rouge de celui que procure l'indol. Il est alors indiqué de s'en rapporter aux observations spectroscopiques.

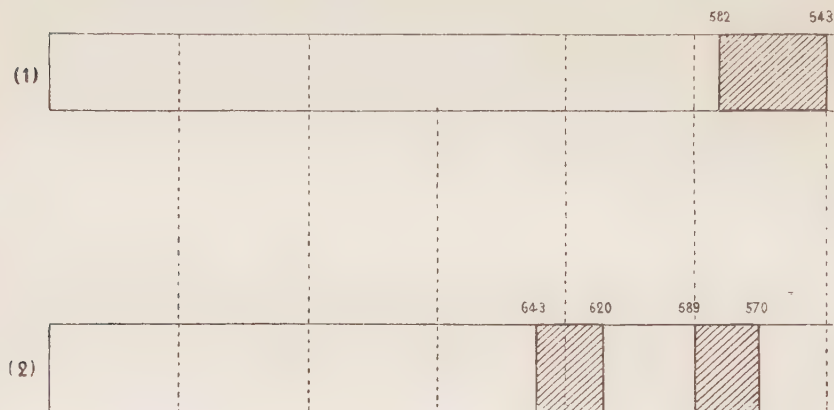
Avec la p. diméthylamino-benzaldéhyde, le scatol donne, en solution aqueuse, une coloration bleue et en solution benzénique, une coloration violette ou rouge violacé.

(21) C. GAUTIER et HERVIEUX. Présence de l'indol dans le gros intestin au cours du jeûne, chez le chien. *C. R. Soc. Biol.*, 61, 223, 1907.

Les spectres des couleurs fournies par l'indol et le scatol peuvent servir à caractériser ces composés.

1^o La couleur rouge obtenue avec l'indol, en solution aqueuse, examinée sous une épaisseur de cinq millimètres et à degré de concentration convenable, donne un spectre caractérisé par la présence d'une bande dans le jaune vert (22), entre $\lambda = 582$ et $\lambda = 543$.

2^o Avec le scatol, la couleur bleue obtenue également en solution aqueuse, fournit un spectre à deux bandes; l'une située dans le rouge, très nette, entre $\lambda = 643$ et $\lambda = 620$, et l'autre, moins nette, dans le jaune, entre $\lambda = 589$ et $\lambda = 570$.



1. Spectre de la solution aqueuse d'indol (solution colorée en rouge).
2. Spectre de la solution aqueuse de scatol (solution colorée en bleu).

2^o RÉACTION DES AZOÏQUES

Pour la recherche de l'indol, on prépare d'abord la solution suivante :

Azotite de sodium. 0 gr. 2
Eau 1 litre

et on opère comme il suit : à 10 cc. d'une solution alcoolique ou aqueuse d'indol, on ajoute 1 cc. de la liqueur précédente; on ne

(22) PRÖSCHER. Zur Kenntniss der Erlich'schen Dimethylamidobenzaldehydreaktion. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 31, 520, 1901.

doit, à ce moment, observer aucune coloration. Puis on fait tomber goutte à goutte et très lentement de l'acide sulfurique concentré; des stries d'un rouge foncé apparaissent d'abord dans le sein du liquide, lequel se colore finalement, après agitation, uniformément en rouge cramoisi. Si l'on s'est servi d'une solution aqueuse d'indol, la couleur rouge peut être rassemblée facilement par l'alcool amylique.

Si le scatol ne donne pas la réaction des azoïques, il n'en est pas moins ~~vrai~~ que celle-ci n'est pas spécifique de l'indol. On sait, en effet, que beaucoup de corps, dans les conditions dont nous venons de parler, donnent des colorations analogues. Nous ajouterons que la réaction des azoïques est beaucoup moins sensible que celle à la p. diméthylamino-benzaldéhyde. Malgré cela, elle est cependant très employée, et à tort selon nous, par les bactériologistes, pour la caractérisation de l'indol dans les bouillons de culture. Il serait à souhaiter qu'ils utilisassent davantage le réactif d'EHRlich, car l'azotite de soude donne très souvent des tons roses peu nets.

3° RÉACTION DE LEGAL AU NITROPRUSSATE DE SODIUM

BELA DE BITTO (23) a utilisé, pour la recherche de l'indol, la réaction donnée par LEGAL pour déceler l'acétone.

Dans cette réaction, on emploie la solution suivante :

Nitroprussiate de sodium	1 gr.
Eau	20 cc.

A 10 cc. d'une solution aqueuse ou alcoolique d'indol, on ajoute 10 gouttes de la solution de nitroprussiate, puis 5 gouttes de lessive de soude à 30 %. On ne doit pas observer de coloration; mais par addition d'une dizaine de gouttes d'acide acétique cristallisable, il se développe une belle coloration bleue.

La réaction se fait également bien par superposition, et elle est même plus sensible que dans les conditions précédentes. Il suffit

(23) BELA DE BITTO. Ueber das Nitroprussidnatrium als Reagens auf Aldehyde und Ketone. *Annal. der Chem.*, **269**, 378, 1892.

de faire arriver lentement l'acide acétique dans le fond du tube au moyen d'une pipette effilée; à la zone de séparation apparaît un anneau bleu vert foncé.

Si l'on opère sur une solution alcoolique d'indol, on observe, déjà après l'addition de lessive de soude, une coloration qui, selon la concentration, est rouge ou violette et qui devient d'un bleu intense lorsqu'on termine par l'acide acétique.

Le scatol ne donne pas la réaction de LEGAL, qui n'est pas non plus spécifique de l'indol. On sait qu'elle sert très souvent à caractériser l'acétone.

4^o RÉACTION DU COPEAU DE SAPIN CHLORHYDRIQUE

Un petit fragment de sapin imbibé d'acide chlorhydrique fumant, puis arrosé de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'indol, prend rapidement une teinte rouge violacé.

On peut encore tremper le copeau de sapin dans une solution alcoolique d'indol acidulée par l'acide chlorhydrique.

Cette réaction, qu'on obtient également avec le scatol, ne se produit plus avec le diméthylindol; il en est ainsi, d'ailleurs, toutes les fois que les deux sommets carbonés du noyau pyrrol possèdent des chaînes latérales (24).

5^o RÉACTION DE L'ALDÉHYDE FORMIQUE OU DE KONTO

KONTO (25) a eu l'idée d'appliquer à la recherche de l'indol une réaction employée pour celle de l'albumine; voici dans quelles conditions :

On traite une solution diluée d'indol par quelques gouttes d'aldéhyde formique et d'acide sulfurique concentré; on obtient une coloration rouge-violet.

Cette réaction, bien que sensible, l'est cependant moins que la réaction d'ERLICH. Selon KONTO, de petites quantités de scatol ne la gênent pas.

(24) BAEYER. Ueber die Reduktion der aromatischen Verbindungen mittelst Zinkstaub. *Annal. der Chem.*, **140**, 293, 1866.

(25) KONTO. Ueber eine neue Reaktion auf Indol. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **48**, 183, 1906.

6° RÉACTION A L'EAU DE CHLORE

Avec l'eau de chlore, l'indol donne une coloration rouge, le scatol ne donne rien. C'est à cette réaction que répond ce qu'avait obtenu Claude BERNARD (26), lorsqu'il traitait le suc pancréatique putréfié par l'eau de chlore.

L'indol donne des produits d'addition bien cristallisés, notamment avec quelques corps aromatiques.

1° AVEC L'ACIDE PICRIQUE

Si l'on mélange deux solutions benzéniques chaudes, la première d'indol et la seconde d'acide picrique, ces deux corps se combinent molécule à molécule et par refroidissement ou par évaporation, il se forme de belles et longues aiguilles de couleur rouge vif, très brillantes. C'est du *picrate d'indol* : $C^8H^7Az, C^6H^3(AzO^2)^3OH$.

Ce composé est difficilement soluble dans le benzène froid et le sulfure de carbone, très soluble dans le benzène bouillant et presque insoluble dans la ligroïne; aussi lorsque les solutions benzéniques d'indol ne sont pas suffisamment concentrées, le picrate formé pouvant rester en solution, on le précipitera par addition d'éther de pétrole, puis on le fera cristalliser dans la quantité juste suffisante de benzène.

L'union facile de l'acide picrique à l'indol n'est pas caractéristique de celui-ci, car tous les indols donnent aisément des picrates.

Mais alors que le picrate d'indol est détruit par chauffage en présence de lessive de soude sans régénérer l'indol, le picrate de scatol est simplement décomposé avec mise en liberté de scatol. Nous verrons plus tard à utiliser cette réaction (27, 28).

(26) CLAUDE BERNARD. Mémoire sur le pancréas et sur le rôle du suc pancréatique dans les phénomènes digestifs. *C. R. Acad. Sc.* Supplément au t. 4, 18, 1854.

(27) BAEYER. Untersuchungen über die Gruppe des Indigoblaus. *Berichte*, 12, 1309, 1879.

(28) BAEYER. Ueber die Beziehung der Zimmtsäure zu der Indigogruppe. *Berichte*, 13, 2254, 1888.

2° AVEC LE TRINITROBENZÈNE

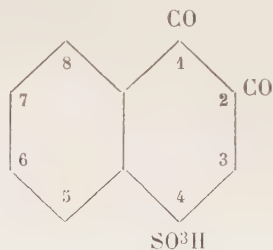
ROMBURGH (29) a montré qu'une solution alcoolique d'indol donne avec une solution alcoolique de *trinitrobenzène symétrique* : $C^6H^3(AzO^2)^3$ 1.3.5, un produit d'addition qui se présente sous la forme d'un précipité cristallisé jaune d'or, apparaissant surtout lorsque l'alcool s'évapore et fondant à 187° : $C^8H^7Az + C^6H^3(AzO^2)^3$.

Cette réaction n'offre pas, au point de vue qui nous intéresse, une grande sensibilité; il faut, en effet, pour l'obtenir, des solutions concentrées d'indol.

Le scatol en solution alcoolique donne un précipité cristallin, rouge foncé, se formant plus rapidement, de trinitrobenzène-scatol, fondant à 183° (30).

3° AVEC LE β NAPHTOQUINONE 4. MONOSULFONATE DE POTASSIUM

HERTER et FOSTER (31, 32, 33) préfèrent à l'acide picrique, pour séparer l'indol et le scatol qui pourraient être mélangés, le sel de potassium ou de sodium de l'acide β naphtoquinone 4. monosulfonique :



(29) V. ROMBURGH. Sur quelques combinaisons du trinitrobenzène symétrique. *Rec. travaux chim. des Pays-Bas*, **14**, 63, 1895.

(30) STAAL. Ueber das Chromogen des sogenannten skatolrothes im normalen Menschenharn. *Zeitschr. für physiol. chem.*, **46**, 252, 1905.

(31) HERTER et FOSTER. On a method of determining indol. *Proced. of the Soc. for experim. Biol. and Medic. New-York*, 24 mai 1905.

(32) HERTER et FOSTER. A method for the quantitative determination of indol. *Journ. of Biol. chem.*, **1**, 257, 1906.

(33) HERTER et FOSTER. On the separation of indol from skatol and their quantitative determination. *Journ. of Biol. chem.*, **2**, 267, 1906.

En solution faiblement alcaline, l'indol se combine facilement avec le β naphthoquinone 4.monosulfate de K ou de Na en donnant un produit cristallisé bleu grisâtre, peu soluble dans l'eau et que le chloroforme enlève à la liqueur aqueuse en prenant une teinte rose. Le produit obtenu serait formé de l'union de sept molécules d'indol avec une molécule de β naphthoquinone 4.monosulfonate alcalin. Sa solubilité dans le chloroforme est 1/4,000. GORTER et DE GRAAF (20) ont fait récemment des remarques intéressantes au sujet de ~~la~~ méthode d'HERTER et FOSTER pour la détermination quantitative de l'indol : ils ont constaté, contrairement à ce qu'avaient avancé ces derniers auteurs que le scatol ne se combine pas avec le réactif indiqué par ceux-ci.

Ils ont également observé que l'ammoniaque masque la réaction ; il est donc recommandé de suivre exactement les indications fournies par HERTER et FOSTER pour la recherche de l'indol dans les fèces :

1° Effectuer un premier entraînement à la vapeur d'eau des matières fécales en un milieu légèrement alcalin ; l'indol passera plus facilement, disent GORTER et DE GRAAF, que si l'on avait acidulé ;

2° Procéder à un deuxième entraînement des eaux de condensation ainsi obtenues, lesquelles renferment de l'ammoniaque, après acidulation préalable à l'aide de l'acide sulfurique ;

3° Ajouter le réactif et extraire la couleur à l'aide du chloroforme jusqu'à ce que celui-ci ne se teinte plus en rose. Faire une détermination quantitative par voie colorimétrique en prenant pour l'étalonnage une solution très légère d'indol d'un titre connu.

Pour GORTER et DE GRAAF, la réaction d'HERTER et FOSTER est sensible à 1/8.000.000.

4° AVEC LE BISULFITE DE SODIUM

Hess (34) a indiqué un moyen d'extraire l'indol des essences végétales, en le combinant au bisulfite de sodium en solution hydro-alcoolique.

Il ne dit pas si ce procédé réussit avec le scatol.

(34) Hess. Ueber ätherisches Jasminblüthenöl. *Berichte*, 34, 2916, 1902.

On agite une solution étherée d'indol avec une solution hydro-alcoolique de bisulfite de sodium; on obtient un précipité qui, redissout dans l'alcool méthylique, dans lequel il est d'ailleurs peu soluble, donne des feuillets blancs lorsque l'alcool s'évapore.

La combinaison obtenue traitée par le carbonate de soude ou l'ammoniaque régénère l'indol.

5° AVEC LE CHLORURE MERCURIQUE

Lorsqu'on traite une solution aqueuse ou alcoolique d'indol par un excès d'une solution également aqueuse ou alcoolique saturée de chlorure mercurique, on obtient immédiatement un précipité blanc grenu, entraînant tout l'indol sous forme d'une combinaison dans laquelle l'odeur caractéristique de ce corps a disparu.

Cette réaction, non encore signalée, est, entre toutes les réactions de précipitation de l'indol, celle qui nous apparaît comme la plus sensible.

Le scatol, même en solution alcoolique concentrée, ne donne aucun précipité avec le sublimé corrosif; même au bout de plusieurs jours, il ne se produit qu'un très faible dépôt coloré en brun.

L'indol et le scatol se trouvant presque toujours associés dans les liquides physiologiques, nous croyons bon de résumer les principales réactions de ces corps dans le tableau suivant :

	Indol	Scatol
Acide sulfurique	0	0
Acide azotique fumant.	Aiguilles rouges.	0
Eau de chlore.	Color. rouge.	0
Copeau de sapin chlorhydrique .	Color. rouge.	Color. rouge.
Azotite de sodium et acide sulfurique . . .	Color. rouge.	0
Acide picrique	Cristaux rouges.	Cristaux rouges.
Paradiméthylaminobenzaldéhyde	Color. rouge en sol. aqu ^{se} ou benzénique.	Color. bleue en sol. aqueuse, violacée en sol. benzénique.
Trinitrobenzène.	Aiguilles jaunes.	Aiguilles rouges.
Nitroprussiate de sodium . . .	Color. bleue.	0
Azotite de sodium en sol acétique	Précipité rouge foncé.	Jaune.
Formol	Rouge.	Jaune pâle.
2 Naphloquinone 4 monosulfonate de sodium.	Précipité.	0
Chlorure mercurique	Précipité blanc.	0

Entre toutes ces réactions, nous croyons bon de recommander à cause de leur sensibilité et parfois de leur spécificité en regard du scatol seul :

- 1° La réaction d'EHRlich à la p. diméthylamino-benzaldéhyde ;
- 2° La réaction d'HERTER et FOSTER au β naphthoquinone 4. mono-sulfonate de potassium ;
- 3° Le sublimé corrosif.

Extraction et préparation de l'indol.

BAEYER (35, 36), en 1868, a obtenu l'indol pour la première fois par la suite des réactions suivantes :

On réduit l'indigotine au moyen de l'étain et de l'acide chlorhydrique jusqu'à complète décoloration ; puis le produit de la réduction après filtration est séché et distillé en présence de poudre de zinc. L'huile qui passe à la distillation est lavée à l'acide chlorhydrique étendu, puis redistillée ; l'indol cristallise dans le réfrigérant et il suffit de l'essorer pour l'obtenir pur.

Plus tard, BAEYER obtint l'indol en fondant de l'acide nitrocinnamique avec de la potasse en présence de tournure de fer, ou encore en faisant passer de l'orthodiéthyltoluidine dans un tube chauffé au rouge (BAEYER et CARO) (37).

L'indol a été caractérisé pour la première fois dans les produits de fermentation de l'albumine par NENCKI (38). Quelques mois avant NENCKI, il avait été entrevu par KÜHNE (39).

NENCKI soumettait l'albumine du sang à l'action digestive du tissu pancréatique ; dans ces conditions, l'indol est toujours accompagné de son homologue, le scatol.

(35) BAEYER. Ueber die Reduktion des Indigoblaus. *Berichte*, **1**, 17, 1868.

(36) BAEYER et EMMERLING. Synthèse des Indols. *Berichte*, **2**, 679, 1869.

(37) BAEYER et CARO. Ueber die Synthese des Indols aus Abkömmlingen des Anilins. *Berichte*, **10**, 1262, 1877.

(38) NENCKI. Ueber die Bildung des Indols aus Eiweiss. *Berichte*, **8**, 336, 1875.

(39) KÜHNE. Ueber Indol aus Eiweiss. *Berichte*, **8**, 206, 1875.

Plus tard, SALKOWSKI (40, 41, 42) modifie et simplifie le procédé de NENCKI et donne un moyen commode et sûr pour extraire l'indol des produits de putréfaction de l'albumine. Il opère de la façon suivante :

Le produit de la putréfaction, sans avoir été filtré, est distillé jusqu'à ce que le résidu ait une consistance poisseuse ; on ajoute de l'eau à ce résidu et on distille à nouveau. Le distillat est acidulé par l'acide chlorhydrique et agité avec de l'éther. La liqueur aqueuse restant après épuisement par l'éther ne renferme guère que AzH^+Cl ; mais l'extrait étheré tient en solution l'indol, le scatol, les phénols et des acides.

Pour se débarrasser des phénols et des acides, on agite l'extrait étheré avec une lessive faible de soude qui les dissout entièrement et les fait passer dans la portion aqueuse du mélange, tandis que l'indol et le scatol restent en solution dans l'éther.

La portion étherée est évaporée, le résidu additionné de lessive de soude, puis soumis à un entraînement à la vapeur d'eau. L'indol et le scatol seuls passent à la distillation. On les dissout dans l'éther par agitation du distillat avec ce dissolvant.

Pour séparer l'indol du scatol, SALKOWSKI a utilisé leurs différences de solubilité dans l'eau ; le scatol précipite facilement de sa solution alcoolique par addition d'un excès d'eau, alors que l'indol reste encore en solution.

L'indol serait aussi, d'après SALKOWSKI, moins entraînable à la vapeur d'eau que le scatol ; il s'agit là, à notre avis, d'une différence si difficile à apprécier que toute séparation basée sur elle nous semble incapable de donner de bons résultats.

On peut encore faire les pierates de ces deux corps et distiller leur mélange en présence de lessive de soude ; dans ces conditions, si le scatol passe à la distillation, on sait que l'indol est détruit.

(40) SALKOWSKI. Zur Kenntniss der Eiweissfäulniss. — I. Ueber die Bildung des Indols und Skatols, gemeinschaftlich mit H. Salkowski. *Zeitschr. für physiol. chem.*, **8**, 417, 1884.

(41) SALKOWSKI. Zur Kenntniss der Eiweissfäulniss. — II. Die Skatol-carbonsäure. *Zeitschr. für physiol. chem.*, **9**, 8, 1885.

(42) SALKOWSKI. Zur Kenntniss der Eiweissfäulniss. — III. Ueber die Bildung der nicht hydroxylierten aromatischen Säuren. *Zeitschr. für physiol. chem.*, **9**, 491, 1885.

OBTENTION D'INDOL PAR FUSION ALCALINE DES ALBUMINES

BOPP (43), le premier, a trouvé qu'en fondant de l'albumine avec les alcalis fixes, on obtenait une substance volatile, possédant une odeur fécaloïde, et qui était analogue à celle obtenue dans la putréfaction de la caséïne.

MULDER (44), déjà avant BOPP, avait bien fait agir la potasse sur les albuminoïdes, mais, comme il n'avait utilisé que des alcalis dilués, il n'avait pu obtenir que des corps peptoniques : les protéines-oxydes.

KÜHNE (39) a modifié la technique de BOPP de la façon suivante : au lieu de prendre des poids égaux d'alcali fixe et d'albumine, il employait un poids huit fois plus grand d'alcali.

La masse était chauffée dans une marmite de fonte jusqu'au rouge sombre. Dans ces conditions, on obtient un corps qui, sauf le point de fusion, correspond par toutes ses autres propriétés à l'indol ; mais KÜHNE n'osait affirmer que son produit fût identique à l'indol obtenu par BAEYER (35) en partant de l'indigotine.

ENGLER et JANECKE (45), dans le but de voir ce que pouvait bien être le corps obtenu par KÜHNE en 1875, ont repris les expériences de celui-ci.

Ces auteurs opèrent exactement comme KÜHNE, mais au lieu de s'arrêter à la température du rouge sombre, ils chauffent davantage, jusqu'à ce que des gouttelettes brunâtres apparaissent dans le tube de dégagement. Lorsque la masse est refroidie, ils ajoutent de l'eau à plusieurs reprises et distillent tant qu'on obtient un dépôt cristallin dans le réfrigérant : il est ainsi procédé à cinq distillations.

Avec l'albumine de l'œuf, ENGLER et JANECKE obtinrent un corps cristallisant en feuillets, donnant avec le copeau de sapin chlorhy-

(43) BOPP. Einiges ueber Albumin, Casein und Fibrin. *Annal. der Chem.*, 69, 31, 1849.

(44) MÜLDER. Ueber die Einwirkung verdünnter Kalilauge auf Eiweiss. Cité par NENCKI. (Voir *Opera omnia*. NENCKI.)

(45) ENGLER et JANECKE. Beiträge zur Bereitungsweise des Indols. *Berichte*, 9, 1411, 1876.

drique une coloration rouge, et avec l'acide azotique fumant une coloration, puis un précipité rouges.

Ce produit fondait à 70°; après purification, le point de fusion s'élevait jusqu'à 83°, alors que l'indol obtenu par BAEYER (35), par réduction de l'indigotine, fondait à 52°.

Le poids moléculaire et la densité de vapeur du corps obtenu ne concordaient pas avec ceux de l'indol.

Ces différences ont engagé ENGLER et JANECKE à considérer ce corps non comme de l'indol, mais comme un *pseudo-indol*.

Ce fut NENCKI (46) qui montra que la *substance de Kühne*, le pseudo-indol de ENGLER et JANECKE n'était pas une espèce chimique, mais bien un mélange d'indol et d'une substance nouvelle découverte par BRIEGER (9) et par SÉCRETAN (47) dans l'albumine et désignée sous le nom de *scatol*.

Le produit obtenu par KÜHNE, ENGLER et JANECKE renfermait un peu d'indol, mais surtout du scatol. NENCKI (48), dans ses expériences, prenait 50 gr. d'albumine et 500 gr. de potasse caustique et chauffait le mélange dans une capsule de fonte recouverte d'un chapiteau muni d'un réfrigérant. Il élevait insensiblement la température, et, après cinq à six heures de chauffe, alors qu'il ne passait plus rien, il laissait refroidir.

Le résidu additionné d'eau est distillé: on obtient un liquide louche, rougissant avec une goutte d'acide azotique fumant. Ce traitement est répété trois ou quatre fois; les distillats réunis sont neutralisés par l'acide chlorhydrique et traités par l'acide picrique; l'indol et le scatol précipitent. Par distillation, *en présence d'ammoniacque*, des picrates de ces deux corps, on obtient un mélange d'indol et de scatol bien cristallisés.

La séparation de l'indol et du scatol est effectuée en utilisant leurs différences de solubilité dans l'eau; le rendement est de 0,20-0,25 o/o.

(46) NENCKI. Zur Kenntniss der Fäulnisprocesse. *Berichte*, 10, 1032, 1877.

(47) SÉCRETAN. *Recherches sur la putréfaction de l'albumine et sur sa transformation en graisse*. Thèse inaugur. Université Genève, 1876, 14 pages.

(48) NENCKI. Ueber die Zersetzung des Eiweisses durch schmelzenden Kali. *Journ. für prakt. chem.*, 17, 97, 1877.

Il faut avoir soin d'élever lentement la température, car la masse se boursoufle en dégageant de l'ammoniaque et du pyrrol; pour éviter autant que possible une trop grande production de pyrrol, NENCKI conseille de chauffer au bain d'huile entre 260° et 290°.

EXTRACTION DE L'INDOL DES EXCRÉMENTS

BRIEGER (9), en 1877, a extrait pour la première fois l'indol des excréments; sa technique a été peu modifiée depuis.

Les excréments (5 kil.) sont délayés dans l'eau de façon à obtenir une bouillie claire, puis acidulés par l'acide acétique (200 cc.); on distille au bain de sable jusqu'à ce qu'il soit passé environ un tiers du volume. On obtient un distillat et un résidu; le résidu ne renferme plus d'indol; celui-ci est entièrement passé dans le distillat. Ce dernier est saturé par de la lessive de soude qui retient les acides gras volatils et les phénols, puis redistillé de façon à obtenir un tiers environ du volume initial; l'indol et le scatol passent à la distillation.

Pour les obtenir, on agite la liqueur aqueuse avec un tiers de son volume d'éther; l'extract éthéré évaporé laisse un résidu oléagineux que l'on reprend par une très faible quantité d'eau bouillante et on filtre à chaud. Par refroidissement, le scatol précipite, alors que l'indol reste en solution aqueuse. Les rendements sont faibles et la précipitation par l'eau défectueuse, car il reste toujours un peu de scatol non précipité mélangé à l'indol.

Le procédé de BRIEGER convient assez bien, mais nous estimons que pour mieux conduire les distillations, il est bon d'effectuer celles-ci dans un courant de vapeur d'eau.

PRÉPARATION DE L'INDOL PAR SYNTHÈSE

On obtient de l'indol synthétiquement :

1° *En traitant les amines aromatiques par les aldéhydes halogènes 1-2.*

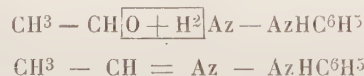
C'est ainsi que l'aniline réagit sur l'aldéhyde monochlorée ou chloro-éthanal $\text{CH}_2\text{Cl} - \text{CHO}$ pour donner, avec élimination d'eau et d'acide chlorhydrique, naissance à l'indol.



On chauffe au réfrigérant à reflux une partie de monochloraldéhyde et deux parties d'aniline, jusqu'à ce que l'odeur d'aldéhyde ait disparu. On distille l'eau qui s'est formée au début de la réaction et la masse résiduelle est portée à 210°-230°. L'indol obtenu est entraîné ultérieurement par un courant de vapeur d'eau.

Au lieu de l'aldéhyde monochlorée, on peut employer l'éther chlorhydrique qui coûte moins cher; mais, dans ce cas, il faut chauffer très longtemps pour décomposer les produits intermédiaires qui se sont formés (49, 50, 51).

2° *Au moyen des phénylhydrazones* (E. FISCHER) (52, 53, 54). On ajoute des poids équimoléculaires d'aldéhyde éthylique et de phénylhydrazine; il se sépare de l'eau que l'on décante et on obtient un liquide épais qui est l'hydrazone correspondante à l'aldéhyde.



Cette hydrazone est fondue avec cinq fois son poids de chlorure de zinc, au bain d'huile à 180°, pendant cinq minutes; il se dégage de l'ammoniaque et il reste une masse compacte qu'on pulvérise et qu'on soumet à un entraînement dans un courant de vapeur d'eau. L'indol obtenu se prend en cristaux déjà dans le réfrigé-

(49) BERLINERBLAU. Indol aus Dichloroäther und Anilin. *Berichte*, **20**, 328, 1887; et *Monatshefte für Chem.*, **8**, 180, 1887.

(50) BERLINERBLAU et POLIKIER. Ueber die bei der Indolbildung aus Dichloroäther und aromatischen Aminen entstehenden Zwischenprodukte. *Monatshefte für Chem.*, **8**, 187, 1887.

(51) NENCKI et BERLINERBLAU. Verfahren zur Darstellung von Indol und Methylketol. *Berichte*, **20**, 753, 1887.

(52) E. FISCHER. Synthese von Indolderivaten. *Annal. der Chem.*, **233**, 116, 1886.

(53) E. FISCHER. Synthese von Indolderivaten. *Berichte*, **19**, 1563, 1886.

(54) HEGEL. Ueber einige Indolderivaten. *Annal. der Chem.*, **232**, 214, 1886.

rant. On le purifie par dissolution et recristallisation dans le benzène ou la ligroïne.

C'est ce mode de synthèse de l'indol, en partant de l'hydrazone de l'aldéhyde, qui a permis à E. FISCHER de fixer exactement la formule de ce corps.

FILLETI (55), a montré que l'indol se forme quand on fait passer des vapeurs de scatol dans un tube rempli de fragments de porcelaine et porté au rouge, mais le rendement est très faible.

Procédés de séparation de l'indol et du scatol.

Les procédés de séparation de l'indol et du scatol sont basés soit sur des différences de propriétés physiques (solubilité dans l'eau), soit sur certaines réactions chimiques (picrates). Nous allons les passer en revue.

A. — *Différences de solubilité* : Nous avons déjà rappelé que l'indol est plus soluble dans l'eau à froid que le scatol.

Ce procédé de séparation, utilisé par SALKOWSKI, NENCKI, ne donne que des résultats approchés, et c'est ainsi que l'indol resté en solution est toujours souillé d'un peu de scatol qui n'a pas précipité et dont il est très difficile de le séparer.

Voici comment ces auteurs procèdent :

a) Le résidu obtenu après évaporation de l'éther, lequel a enlevé indol et scatol aux liqueurs aqueuses obtenues en fin de préparation, est dissous dans une petite quantité d'alcool fort. On filtre et on ajoute un excès d'eau froide; le scatol précipite partiellement, l'autre partie reste en solution avec l'indol. En répétant cette opération, on peut obtenir de l'indol *presque* pur. Ce mode de séparation donne des rendements très mauvais.

b) Le résidu provenant de l'évaporation de l'éther est dissous dans une petite quantité d'eau bouillante et filtré à chaud. Par refroidissement, il se précipite du scatol sous forme de paillettes;

(55) FILETI. Transformazione dell scatol in indol e preparazione dell' indol. *Gazzetta chimic. ital.*, 13, 378, 1883.

mais, comme nous l'avons déjà dit, il en reste toujours en solution à côté de l'indol. Les rendements sont mauvais, surtout si l'on a affaire à des petites quantités de substance, ce qui est généralement le cas en chimie physiologique.

B. — *Picrates* : La transformation en picrates de l'indol et du scatol, en vue de la séparation de ces corps, n'a d'intérêt qu'en ce qui concerne le scatol.

En effet, le picrate d'indol est décomposé par la lessive de soude à l'ébullition, avec destruction de la molécule indol, tandis que celui de scatol est simplement dédoublé dans les mêmes conditions en ses deux constituants; le scatol libéré de sa combinaison passe à la distillation.

En distillant les picrates en présence d'ammoniaque aqueuse, l'indol et le scatol passent tous les deux; ce procédé ne peut donc servir à la séparation de ces deux corps.

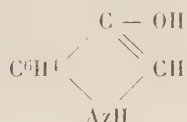
C. — *Par précipitation au moyen du chlorure mercurique* : Si l'on traite une liqueur aqueuse renfermant un mélange d'indol et de scatol par une solution aqueuse saturée de chlorure mercurique, l'indol donne un précipité blanc volumineux, alors que le scatol reste en solution dans la solution de sublimé en excès.

C'est là une réaction très sensible que nous avons souvent utilisée.

On sépare par filtration ou centrifugation le précipité indolique dont on régénère l'indol en le décomposant par H_2S , après l'avoir mis en suspension dans de l'eau distillée. Le scatol sera entraîné par un courant de vapeur d'eau de la liqueur aqueuse, au sein de laquelle on avait précipité l'indol par $HgCl^2$.

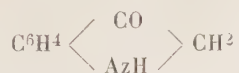
DE L'INDOXYLE

Parmi les dérivés oxygénés de l'indol, celui dont l'étude nous retiendra plus spécialement est l'indoxyle ou hydroxy-3 indol :



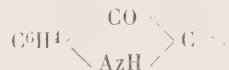
On peut le considérer comme un phénol pyrrolique.

La formule ci-dessus s'applique à l'indoxyle libre; mais, dans ses combinaisons, l'indoxyle réagit souvent sous la forme tautomère, non isolable, bien entendu : le pseudo-indoxyle, qui pour BAEYER posséderait une fonction cétonique



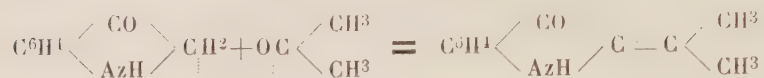
C'est la forme pseudo-indoxyle qui fonctionne en présence des aldéhydes, des cétones, des acides-aldéhydes, des acides-cétones pour donner, après élimination d'une molécule d'eau, des produits de condensation qui ont reçu le nom générique d'*indogénides*.

On peut concevoir encore ces derniers, comme dérivant du résidu bivalent provenant directement du pseudo-indoxyle :

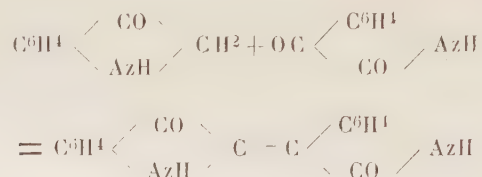


et qui est désigné sous le nom d'*indogène*.

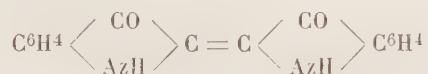
C'est ainsi que le produit de condensation de l'acétone avec l'indoxyle répond à la formule :



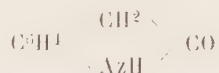
L'*indirubine* ou *indigo rouge*, que l'on peut obtenir en copulant l'indoxyle avec l'isatine, peut être considéré comme l'indogénide de l'isatine :



L'*indigotine* elle-même ou *indigo bleu*, sous sa formule la plus simple, n'est autre que le di-indogène :



On connaît encore un isomère de position du pseudo-indoxyle : l'oxindol, qui a pour formule :



et que l'on peut considérer comme la lactame de l'acide o. aminophénylacétique.

Le passage de l'indol à l'indoxyle n'est pas seulement le fait d'une simple oxydation théorique; il a pu être effectué directement par certains oxydants, dont l'ozone (NENCKI) (56) et l'eau oxygénée (PORCHER) (57).

(56) NENCKI. Ueber das Indol. *Berichte*, **8**, 722, 1875.

(57) PORCHER. Action de l'eau oxygénée sur l'indol. *Bull. Soc. Chim* (4), **3**, 229, 1908.

Propriétés physiques.

L'indoxyle se présente ordinairement sous la forme d'une huile brunâtre qui s'épaissit et se résinifie facilement.

Ce corps a cependant été préparé à l'état cristallisé par VORLÄENDER et DRESCHER (58). Ces auteurs ont obtenu des cristaux jaunes en décomposant l'acide indoxylique dans un courant de gaz d'éclairage.

L'indoxyle fond à 83°, il est soluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, en donnant des solutions fortement dichroïques, qui perdent cette propriété en présence des alcalis fixes, ou d'un excès d'acide chlorhydrique.

L'indoxyle serait entraînable par la vapeur d'eau, et sa vapeur posséderait une odeur de matières fécales? Son poids moléculaire est de 119.

Propriétés chimiques.

Action des oxydants. — L'oxydation de l'indoxyle donne des produits différents suivant les conditions de milieu dans lesquelles elle s'opère et les oxydants employés.

Lorsqu'elle est ménagée, elle conduit à la formation d'indigotine, toujours mélangée il est vrai d'indirubine: c'est ce que donnent le chlorure ferrique, le chlore et le brome à l'état de traces, et l'oxygène, plus rapidement l'oxygène naissant que l'oxygène de l'air, en milieu chlorhydrique.

En solution alcaline, l'indoxyle est très sensible vis-à-vis des oxydants; l'agitation en présence de l'oxygène de l'air suffit en effet à donner de l'indigo, du bleu de façon prépondérante.

Mais, mise à l'abri de toute oxydation, la solution alcaline d'indoxyle se conserve longtemps sans s'altérer.

Les hypochlorites et les hypobromites en milieu alcalin pous-

(58) VORLÄENDER et DRESCHER. *Berichte*, **35**, 1701, 1902.

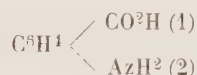
sent l'oxydation plus loin et donnent de l'isatine. Avec le brome, il se fait même de la tribromo-aniline (59).

D'ailleurs, cette formation d'isatine est constante, même dans les conditions où l'on obtient principalement de l'indigo bleu, si l'oxydant agit sur l'indoxyle tout récemment libéré et *en quelque sorte à l'état naissant*.

Nous verrons en effet plus loin que les méthodes dites « aux oxydants », employées pour déceler l'indoxyle urinaire, accusent presque toutes, quelque soin que l'on prenne à ménager l'oxydation, une certaine perte en indigo.

L'oxydant agit en effet sur l'indoxyle dès la mise en liberté de ce dernier par l'action de l'acide employé sur les éthers indoxyliques de l'urine ; l'indoxyle, dans ce cas, présente une très grande sensibilité vis-à-vis des oxydants.

Enfin, si l'oxydation est encore plus accentuée, comme c'est le cas en présence du permanganate de potassium en milieu acide, l'indoxyle donne de l'acide anthranilique ou acide ortho-amino-benzoïque (60).



Le noyau pyrrol, encore entier dans l'isatine, s'ouvre ici en perdant un atome de carbone sous la forme de CO^2 .

Par chauffage avec de la baryte anhydre, l'indoxyle donne de l'aniline. Ici encore, il y a eu oxydation de l'indoxyle avec formation transitoire d'acide o. amino-benzoïque qui a perdu ensuite son CO^2 en présence de la baryte.

Le brome en solution aqueuse donne de la tribromo-aniline qui se dépose sous la forme d'un fin précipité amorphe.

L'indoxyle libre s'unit à l'isatine en présence du carbonate de sodium pour donner de l'indirubine.

L'indoxyle se comporte à la fois comme un corps faiblement acide et faiblement basique ; acide par son OH, basique par son AzH.

(59) BAUMANN et TIEMANN. Ueber die Constitution des Indigos. *Berichte*, 12, 1092, 1879.

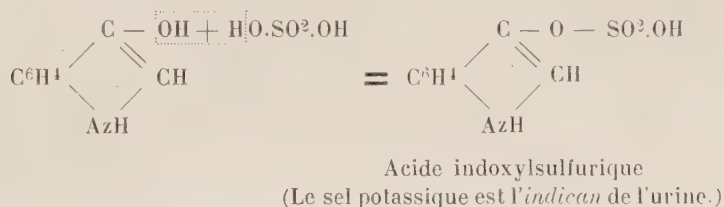
(60) FRITSCHÉ. Ueber die Produkte der Einwirkung von Kali auf Indigoblau. *Annal. der Chem.*, 39, 83, 1841.

Nous en avons fait une sorte de phénol pyrrolique, mais ses analogies avec les phénols sont toutefois assez restreintes.

L'indoxyle ne donne aucune des réactions caractéristiques des phénols. Il ne donne rien avec le réactif de MILLON; il n'est pas entraînable par la vapeur d'eau, ou du moins extrêmement peu, l'eau de brome ne le précipite pas.

Cependant son OH pyrrolique, comme l'OH des phénols est acide, ~~et~~ pour cette raison, l'indoxyle s'unit aux alcalis fixes.

De plus, et c'est là un fait important, l'indoxyle donne des composés que l'on peut considérer comme des éthers-sels: tel est le cas des chromogènes urinaires dérivés de l'indol et en particulier du dérivé sulfurique dont le sel alcalin est l'*indican* de l'urine :

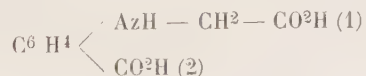


Préparation de l'indoxyle.

L'indoxyle se prépare en partant du phénylglycocolle o. carboxylique ou de l'acide indoxylrique; on peut également en décèler l'existence dans les chromogènes urinaires (*indican*, chromogène indigurique).

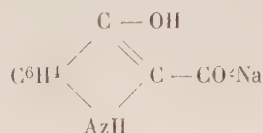
1^o PAR LE PHÉNYLGLYCOCOLLE, O. CARBOXYLIQUE

Lorsqu'on porte à l'abri de l'air, vers 280°, de l'acide phénylglycine-orthocarboxylique :

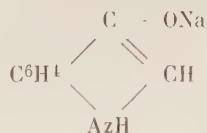


en présence de soude caustique, le mélange se colore en jaune

citron ; le produit de fusion est un mélange d'indoxylcarbonate de sodium :



et d'indoxyle sodé :

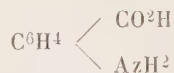


Pour séparer l'indoxyle sodé de l'indoxylcarbonate de Na, on dissout dans l'eau, on neutralise l'excès de soude par un courant de CO^2 et on extrait l'indoxyle sodé par l'éther (61, 62).

2° AU MOYEN DE L'INDIGOTINE

On peut également obtenir l'indoxyle en traitant l'indigotine⁷ par les alcalis en fusion, vers 300°. Dans ces conditions, il n'y a jamais formation d'isatine, sans quoi il se produirait de l'indirubine.

Si l'on continuait à chauffer, il se formerait de l'acide anthranilique :



ainsi que l'a vu FRITZSCH (60) et HENTSCHEL (63).

3° PAR L'ACIDE INDOXYLCARBONIQUE

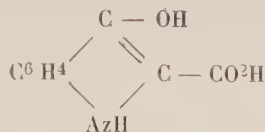
Le meilleur procédé est incontestablement celui qui consiste à

(61) HEUMANN. Ueberführung der Phenylglycin-o-carbonsäure in Indigoblau. *Berichte*, **23**, 3432.

(62) B. A. S. F. Ueberführung der Phenylglycin-o-carbonsäure in Indoxyl und Indoxylsäure. *Berichte*, **29**, 251, 1896.

(63) HENTSCHEL. Ueber das Verhalten des Indigotins in der Kalischmelze. *Journ. für prakt. Chem.*, **168**, 377, 1899.

décomposer l'acide indoxylcarbonique, encore appelé, mais à tort, acide indoxylique

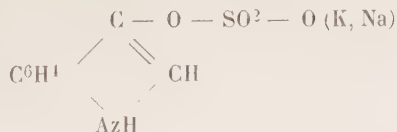


par l'eau à 70°—80° dans un courant de gaz inerte (CO² ou gaz d'éclairage). Il se produit un vif dégagement de CO² et l'indoxyle se rassemble à la surface de l'eau sous forme d'une huile brunâtre, très épaisse. Le liquide aqueux inférieur séparé de cette huile est fortement fluorescent, car il dissout toujours une certaine quantité d'indoxyle que l'on peut enlever par des épuisements à l'éther ou au benzène. La décomposition de l'acide indoxylique doit être opérée avec diligence car, au contact de l'eau, l'oxydation est rapide, et il se forme de l'indigo. Mais en opérant comme il vient d'être dit, dans un courant d'anhydride carbonique, cette oxydation n'est nullement à craindre, la décomposition de l'acide indoxylique est totale et le rendement théorique (64, 59).

L'acide indoxylique est d'ailleurs un composé très instable, même à l'état solide et, peu à peu, au contact de l'air et de la lumière, il perd les éléments de CO², et de gris clair qu'il était, il devient bleu par formation d'indigo.

4° EN PARTANT DE L'INDICAN URINAIRE

Lorsqu'on traite une solution très *concentrée* d'indican urinaire (indoxylsulfate alcalin) (65)

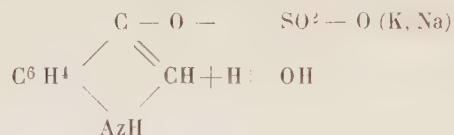


par de l'acide chlorhydrique fumant, il ne se forme pas d'indigo.

(64) BAEYER. Ueber die Verbindungen der Indigogruppe. *Berichte*, 14, 1744, 1881.

(65) BAUMANN et BRIEGER. Ueber die Indoxylschwefelsäure, das Indican des Harns. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 3, 253, 1879.

La liqueur devient dichroïque par mise en liberté d'indoxyle; orangée par transparence, elle est verte par réflexion. On peut la conserver 24 heures et plus sans qu'il y ait à craindre la formation d'indigo. Ce n'est qu'en la diluant et en l'agitant à l'air, après neutralisation par la soude, que l'on constate immédiatement une abondante précipitation d'indigotine. L'acide chlorhydrique a hydrolysé l'indican pour donner d'une part, un sulfate acide alcalin, et d'autre part, de l'indoxyle :



C'est sur cette réaction que sont basés presque tous les procédés qui servent à déceler l'indoxyle urinaire. Nous y reviendrons avec détail un peu plus loin.

5° EN PARTANT DES URINES INDIGURIQUES

Certaines urines riches en éthers indoxyliques et soumises à la putréfaction laissent déposer au bout d'un certain temps un mélange en proportions très variables d'indigo rouge et d'indigo bleu; elles sont dites *indiguriques*.

Le premier effet de la culture microbienne dans l'urine a été de décomposer le chromogène indoxylique spécial auquel est dû ce phénomène et de mettre l'indoxyle en liberté; ce n'est que dans les couches superficielles en contact immédiat avec l'air que l'indoxyle s'oxyde pour donner l'indigo. Si donc, on a soin de conserver ces urines dans des vases que l'on remplit entièrement pour restreindre l'accès de l'air, le liquide présente dans ses portions inférieures un dichroïsme des plus marqués dû à l'indoxyle; ce dichroïsme avait déjà été observé par A. ROBIN (66), mais nous avons été le premier à le rapporter à sa véritable cause (67). Il est facile d'extraire l'indoxyle avec l'éther, le benzène ou l'alcool amylique.

(66) ROBIN. Des urines bleues. *C. R. Soc. Biol.*, 1879.

(67) HERVIEUX. De l'indigurie. *C. R. Soc. Biol.*, 60, 609, 1906.

De plus, si dans cette liqueur urinaire dichroïque, on fait tomber quelques gouttes d'une lessive alcaline, ces dernières, en gagnant le fond du vase, déterminent sur leur passage la formation de stries bleues ou bleu violacé d'indigotine.

Modes d'administration de l'indol.

Nous avons utilisé :

- 1° Les injections sous-cutanées (68);
- 2° L'administration à l'aide de la sonde stomacale.

Tout au début de nos recherches, c'est la voie hypodermique que nous avons employée, mais depuis longtemps déjà nous l'avons abandonnée pour donner notre préférence à l'administration stomacale, parce que la voie d'absorption gastro-intestinale ainsi adoptée est celle que prend l'indol fabriqué normalement dans l'intestin.

Voici comment nous opérons : nous broyons l'indol avec quelques gouttes d'alcool, puis nous y ajoutons un peu d'huile. On chauffe légèrement pour rendre le mélange bien fluide et nous faisons prendre à l'aide de la sonde œsophagienne. On doit éviter l'emploi d'une trop grande quantité d'huile, afin de ne pas provoquer de vomissements chez les animaux en expériences. Il faut également prendre garde à ne pas donner à manger aux animaux trop tôt après l'administration de l'indol; on doit attendre au moins deux ou trois heures.

(68) HERVIEUX. Recherches expérimentales sur les chromogènes urinaires du groupe de l'indol. Des injections sous-cutanées d'indol (1^{er} mémoire). *Journ. Physiol. et Pathol. gén.*, p. 420, mai 1904.

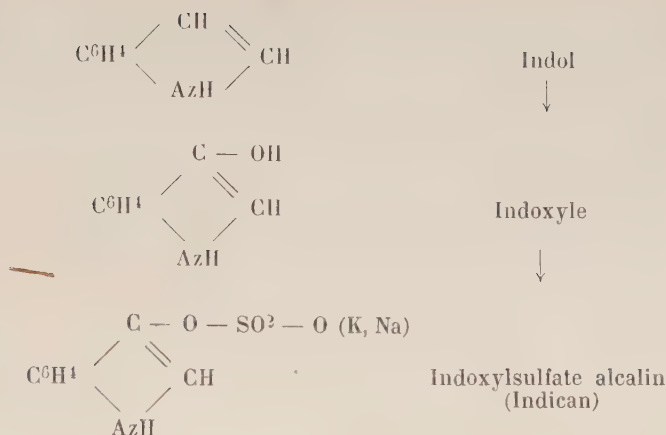
TRANSFORMATIONS SUBIES PAR L'INDOL DANS L'ORGANISME

L'indol produit normalement par l'organisme dans l'intestin, ou administré expérimentalement, se retrouve dans l'urine sous la forme d'indoxyle conjugué.

Cette transformation, au *point de vue chimique*, peut comprendre deux temps : dans le premier, il y a oxydation de l'indol en indoxyle, et, dans le second, éthérification de l'indoxyle, d'abord par l'acide sulfurique, comme cela est connu depuis longtemps, et ensuite, quand celui-ci fait défaut ou est en quantités insuffisantes, par l'acide glycuronique, ainsi que nous le montrerons d'une façon certaine dans ce travail.

Mais *physiologiquement* il n'en est pas ainsi, et il n'est pas douteux que l'oxydation de l'indol et l'éthérification de l'indoxyle se passent simultanément. En effet, si l'éthérification de l'indoxyle devait avoir lieu après l'oxydation de l'indol et non en même temps qu'elle, la facilité avec laquelle l'indoxyle lui-même, injecté sous la peau ou administré par la sonde stomacale, donne naissance à du bleu d'indigo — qui teint le tissu conjonctif sous-cutané dans un large rayon autour du point d'injection ou les parois de l'estomac (6) — nous laisse supposer que là où l'indoxyle serait produit et avant même qu'il ne soit éthérifié, une partie serait transformée en indigo bleu, dont il serait aisé de constater la présence.

Lorsque l'indol n'est formé dans l'organisme qu'en faibles quantités, il est entièrement transformé en *indican* (éther sulfurique de l'indoxyle).



Mais si la quantité d'indol formée est relativement forte, l'organisme ne possédant plus suffisamment de *soufre convenable* pour fournir l'acide sulfurique destiné à l'éthérification de l'indoxyle, l'excès de ce dernier se conjugue à l'acide glycuronique, ainsi que nous le verrons plus loin.

Ce second dérivé indoxylrique, que nous désignerons sous le nom de *chromogène indigurique*, a la propriété importante de se décomposer rapidement sous l'influence de la putréfaction de l'urine, pour donner un abondant dépôt d'indigo.

Enfin, lorsque la quantité d'indol mis en expérience est véritablement trop forte, l'organisme ne possédant plus suffisamment, ni de soufre, ni d'acide glycuronique pour subvenir à la conjugaison avec l'indoxyle, l'excès d'indol passe alors en nature dans l'urine. Cela semble prouver ce que nous avançons il y a un instant, savoir: que l'oxydation de l'indol et la conjugaison de l'indoxyle sont des phénomènes concomitants, car, *a priori*, rien n'empêcherait à l'organisme manquant de soufre ou d'acide glycuronique de pousser au moins la transformation de l'indol jusqu'au stade indoxyle. Mais jamais, nous n'avons pu saisir l'élimination d'indoxyle libre dans l'urine à l'émission, à condition, bien entendu, que la vessie de l'animal ne soit pas infectée.

Il est bien évident, en effet, que si l'urine se putréfie déjà dans la vessie, le conjugué glycuronique qui s'y trouve déversé après l'administration de fortes doses d'indol y sera dédoublé avant la

miction, avec mise en liberté d'indoxyle. Le milieu étant alcalin, par suite de la formation d'ammoniaque dans l'urine, il ne manque plus que de l'oxygène pour que l'indoxyle trouve dans la vessie les conditions favorables à sa transformation en indigo. Cet oxygène faisant défaut dans le sac vésical, ce n'est qu'après la miction que pareille transformation pourra se passer.

PRÉTENDUE TOXICITÉ DE L'INDOL ET DE SES DÉRIVÉS

Au cours de nos nombreuses expériences sur l'indol, nous avons nettement constaté chez tous les animaux, quel qu'en soit le type, le coq aussi bien que le chien, que les fortes ingestions d'indol excitaient le foie au point de provoquer une *abondante* élimination de pigments bilirubiniques dans les excréments.

Ces derniers présentaient la teinte jaune ocracé des dépôts de bilirubine, et il était facile d'en extraire le pigment par agitation avec du chloroforme ou de l'alcool amylique, après acidification préalable par quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

Cette observation nous conduisait à admettre que le foie devait être l'organe principal, sinon exclusif, où la transformation de l'indol en dérivé indoxylique devait avoir lieu; pure hypothèse, admise implicitement par tous les auteurs, mais qu'aucun fait expérimental n'avait positivement et directement démontrée avant nos recherches sur l'extirpation du foie chez la grenouille.

Nous étudierons ce point dans le chapitre suivant, mais auparavant il était intéressant de rechercher si l'indol, l'indoxyle et l'acide indoxylique sont bien réellement des corps aussi toxiques qu'on l'a admis généralement jusqu'à aujourd'hui; c'est, en effet, une notion courante et que nous démontrerons tout à l'heure erronée, que l'indol mis en liberté dans l'intestin, au cours des phénomènes digestifs, est un produit toxique.

Toxicité de l'indol.

CHRISTIANI (69), en 1872, avance qu'on ne connaît rien sur l'action de l'indol sur l'organisme.

Pour JAFFÉ (70), SENATOR (71), l'étude de l'intoxication par l'indol présente un puissant intérêt physiologique par le seul fait que dans nombre de maladies il se produit de grandes quantités d'indol; mais la question posée ne reçoit pas de solution.

En 1879, BAUMANN et BRIEGER (65) avaient administré à un chien vigoureux de 24 kilogrammes, 18 grammes d'indol dans l'espace de cinq jours, sans que cet animal ait été malade; ce fait, cependant remarquable, passa inaperçu.

NENCKI (72) opère sur un chien auquel il donne 1 gr. d'indol; avec cette dose il n'observe pas de phénomènes toxiques, cependant, après une administration de 2 gr., l'animal devient malade et présente à la fois de l'hématurie et de la diarrhée.

Mais ces expériences isolées ne permettaient pas de tirer de déductions sérieuses sur la toxicité réelle ou non de l'indol. Aucunes d'elles n'avaient été poursuivies avec méthode, et c'est la raison pour laquelle les divers auteurs n'y attachèrent par la suite que peu d'importance.

Dans ce travail, nous apportons sur ce sujet un grand nombre de faits nouveaux, qui montrent que non seulement l'indol proprement dit, mais aussi l'indoxyle libre, sont des corps vraiment peu toxiques (73). Nous ne nous sommes pas borné à ces deux corps, et nous avons étendu nos recherches à d'autres indols: le

(69) CHRISTIANI. Phenol und Indol im Thierkörper. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 2, 273, 1872.

(70) JAFFÉ. Ueber Ursprung des Indikans im Harn. *Centralbl. für medic. Wissensch.*, 1, 2, 1872.

(71) SENATOR. Ueber Indikan und Kalkausscheidung im Krankheiten. *Centralbl. für medic. Wissensch.*, 15, 337, 1877.

(72) NENCKI. Zur Geschichte des Indols und der Fäulnisprocesse im thierischen Organismus. *Berichte*, 9, 299, 1876.

(73) HERVIEUX. Sur la prétendue toxicité des corps du groupe de l'indol, *C. R. Soc. Biol.*, 62, 895, 1907.

scatol, le méthylcétol (4), ainsi que l'éthylindol (5), le diméthylindol (6), le triméthylindol (6). Ces trois derniers corps ont été préparés au laboratoire avec M. PORCHER, suivant les indications de PICTET et DUPARC (74), de FISCHER (75) et DEGEN (76).

Nous avons vu ainsi que, en général, ces corps ne sont que peu toxiques, même lorsqu'ils sont donnés à fortes doses.

Dans nos recherches, nous avons expérimenté sur les espèces animales suivantes : lapin, chèvre, poule, chien ; nous les résumons dans le tableau suivant :

ESPÈCES	POIDS	INDOL (en grammes)
Chiens.	14 kg.	2+2+2+3+2 en 5 jours consécutifs.
	20 kg.	2+2 en 2 jours consécutifs.
	14 kg.	2+2+2 1/4 + 2 1/4 + 2 1/2 + 2 1/2 + 2 1/4 + 3 + 3 + 3 + 3 + 3 = 36 gr. 1/4 en 14 jours consécutifs.
	15 kg.	2 gr. 5
	10 kg.	0 gr. 25 + 0 gr. 50.
	8 kg.	0 gr. 4 + 1 gr. 1.
	12 kg.	5 grammes.
	18 kg.	1+1+2+2+2+2+2 = 12 gr. en 7 jours consécutifs.
	30 kg.	3 grammes.
Chèvres		2+3 en 2 jours consécutifs. 10 en une seule fois.
Poules.	1 ^{re}	0 gr. 10 (inject. sous-cutanée).
	2 ^e	1 gramme.
	3 ^e	1 gramme.
Canards		0 gr. 25

(74) PICTET et DUPARC. *Berichte*, 20, 3415, 1887.

(75) FISCHER. Indole aus Phenylhydrazin. *Annal. der Chem.*, 236, 128, 1886.

(76) DEGEN. Indol aus Methylphenylhydrazin. *Annal. der Chem.*, 236, 160, 1886.

En résumé, nous n'avons jamais observé de phénomènes toxiques bien évidents dans la grande généralité de nos expériences, 9 fois sur 10, peut-on dire. Il nous est cependant arrivé quelquefois de noter certains faits qui indiquent que l'organisme ou plutôt quelques-uns de ses parenchymes avaient dû être vivement surexcités par l'indol.

C'est ainsi, nous l'avons déjà dit, qu'il n'est pas rare d'observer une vive décharge intestinale de bilirubine après l'ingestion d'indol; et ce fait est surtout nettement marqué lorsqu'on prolonge l'administration de fortes doses de ce corps.

Nous avons également constaté que des animaux peuvent présenter des troubles graves se traduisant par de fortes hémorragies rénales; la cause de ces hémorragies toxiques, que nous avons rencontrées trois ou quatre fois seulement, nous échappe encore.

Une chienne reçoit, dans l'espace de neuf jours consécutifs, 34 grammes d'indol sans présenter de symptômes d'intoxication.

Plusieurs mois plus tard, le même animal en reçoit 9 grammes en quatre jours; il est alors gravement malade et présente des troubles violents du côté des reins, se traduisant par des hémorragies considérables, que nous avons combattues par des injections sous-cutanées de sérum artificiel caféiné.

Quelque temps après, toujours la même chienne reçoit, dans l'espace de cinq jours, 12 grammes d'indol sans manifester ni trouble général, ni albuminurie, ni hématurie.

Nous insistons sur ce fait que les accidents toxiques qui viennent d'être rapportés n'ont fait suite qu'à des ingestions massives et répétées d'indol. Mais, dans les conditions normales et même pathologiques, comme les proportions d'indol formées dans l'organisme humain n'atteindront jamais la moitié, ni même le quart, voire même peut être le 1/10 de celles qui ont été mises en expérience chez des chiens ne pesant que de 15 à 20 kilogrammes, on peut avancer que notre conclusion générale garde toute sa valeur: l'indol n'est pas toxique.

Mais si ce n'est pas dans l'indol qu'il faut rechercher l'agent causal de l'intoxication lente d'origine intestinale, celle qui fait suite aux phénomènes putréfactifs souvent intenses et prolongés qui se passent dans l'intérieur du tube digestif, il faut reconnaître que *l'indol est le témoin de la formation de produits toxiques développés*

au cours de ces putréfactions. Ces produits, encore mal définis, sont compris sous le nom d'entérotoxines; ils se forment en même temps que l'indol et aux dépens des mêmes substances : les matières protéiques. Toutefois — et c'est ce qui fait jouer un rôle capital à la nature de l'aliment — il peut y avoir formation d'entérotoxine sans indol, comme cela s'observe avec l'alimentation à la gélatine. Mais il s'agit là en somme d'une exception, et l'on peut dire qu'avec une alimentation ordinaire, contenant des albumines d'origine animale (viande, œufs, etc...), comme il se forme simultanément entérotoxines et indol, celui-ci, sans être toxique par lui-même, témoigne, peut-on dire, de la production de substances toxiques.

On conçoit alors que l'indoxyle urinaire, forme extérieure de l'indol, soit le reflet, qualitativement et quantitativement, des putréfactions intestinales.

Toxicité de l'indoxyle libre.

L'indoxyle employé pour ces recherches a été préparé en décomposant l'acide indoxylcarbonique par l'eau bouillante. L'huile brunâtre obtenue a été dissoute dans l'eau, et administrée soit sous la peau, soit *per os*.

Nous avons constaté que l'indoxyle ne présente pas la grande toxicité qu'on lui accorde généralement. Il est vrai que la voie d'administration a une notable influence sur l'effet produit par ce corps; HOPPE SEYLER avait remarqué quelque chose d'analogue avec l'acide orthonitrophénylpropiolique (77, 78). Ainsi un lapin, qui recevait un demi-gramme de cet acide sous la peau, mourait au bout de vingt-quatre heures, tandis qu'un autre lapin, qui recevait la même dose par la bouche, n'en était nullement incommodé.

Injecté sous la peau, l'indoxyle diffuse rapidement en formant,

(77) HOPPE-SEYLER. Ueber das physiologischen Verhalten des o-nitrophenylpropionssäure. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 7, 178, 1882.

(78) PORCHER et HERVIEUX. Recherches expérimentales sur les chromogènes urinaires du groupe de l'indol. Expériences avec l'acide orthonitrophénylpropiolique. *Journ. de Physiol. et Pathol. gén.*, mai 1905.

comme dans le cas de l'acide indoxylcarbonique, une large tâche bleue débordante d'indigotine qui imprègne les tissus tout autour et assez loin du point d'injection.

Nous avons vu des chiens recevoir 0 gr. 5 à 1 gramme d'indoxyle par la bouche sans présenter le moindre phénomène toxique. Les urines de ces animaux étaient toujours riches en conjugués indoxyliques et pouvaient même présenter le phénomène de l'indigurie (6).

D'après nos recherches, nous croyons qu'il n'y a pas lieu d'attribuer à l'indoxyle une réelle toxicité, puisque dans les conditions physiologiques et même pathologiques, les quantités d'indoxyle qui peuvent se former au sein de l'organisme, consécutivement à l'oxydation de l'indol venant de l'intestin, sont toujours bien inférieures à celles qui ont été données dans nos expériences, et dont l'inocuité après administration *per os* a été évidente.

ROLE DU FOIE DANS LA FORMATION DES CONJUGUÉS INDOXYLIQUES

L'indol formé normalement dans le gros intestin sous l'action des microbes ou bien administré expérimentalement, est presque entièrement résorbé et passe dans l'urine à l'état d'éthers de l'indoxyle (indican et chromogène indigurique).

Il était intéressant de rechercher le lieu de formation de ces composés.

Les phénols s'éliminant par les urines sous forme d'éthers analogues, de nombreux physiologistes s'étaient déjà préoccupés de rechercher où s'opérait l'éthérification; rien de plus naturel de voir étendre les résultats trouvés à l'indol, alors même qu'on n'avait pas expérimenté sur celui-ci.

Leurs travaux peuvent se grouper sous deux chefs différents : 1^o *Dosages de ces éthers sulfuriques dans les organes d'animaux divers, normaux ou intoxiqués par le phénol*; 2^o *Essais de synthèse des produits sulfo-conjugués au moyen d'organes extirpés, traversés par une circulation artificielle ou bien broyés*.

Quelques auteurs ont, sur l'animal vivant, essayé d'entraver la production de ces mêmes combinaisons phénoliques, soit par l'exérèse de différents organes, soit en provoquant un trouble dans leur fonctionnement.

Mais, jusqu'à nos recherches faites avec la collaboration de M. Cl. GAUTIER (79, 80), il n'y avait pas d'expériences concernant

(79) GAUTIER et HERVIEUX. Du rôle du foie dans la formation des chromogènes indoxyliques. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 201, 1907.

(80) GAUTIER et HERVIEUX. Les organes formateurs des chromogènes urinaires. Expériences avec l'indol; rôle du foie. *Journ. Physiol. et Pathol. gén.*, n° 4, 593, 1907.

le lieu et le mode de formation de l'indican dans l'organisme.

Toutefois, sans expériences directes, le rôle du foie en cette matière avait été soupçonné depuis longtemps, en raison — nous venons de le dire — d'analogies établies avec ce qui se passe pour les phénols.

Les expériences de PFLUGER, d'EMBDEN (81) ont montré d'une manière évidente que la combinaison des composés oxy-aromatiques avec les radicaux acides a lieu dans le foie.

MUNCK a constaté la présence de sulfo-conjugués et VAN LEERSUM (82, 83), celle de glyco-conjugués dans la bile.

D'autre part, en ce qui nous concerne, nous avons montré, dans un chapitre antérieur, que l'administration de fortes doses d'indol déterminait une abondante décharge de pigments biliaires dans le tube digestif; les excréments, qu'il s'agisse du chien ou du coq, contiennent une forte quantité de bilirubine.

Il ne saurait y avoir une analogie complète en ce qui concerne la nature des processus chimiques qui donnent naissance aux chromogènes urinaires correspondant à l'indol d'une part, aux phénols d'autre part, car si l'indol demande à être d'abord oxydé en indoxyle, lequel est ensuite éthérifié, la phase d'oxydation fait forcément défaut pour les phénols.

Expériences faites pour trouver quel est le rôle du foie dans la formation des chromogènes indoxyliques.

Nous les rangerons en quatre catégories:

- 1° Action de la bouillie de foie sur l'indol;
- 2° Circulation artificielle dans le foie avec du sang défibriné;
- 3° Extirpation du foie chez la grenouille;
- 4° Intoxication lente par le phosphore.

(81) EMBDEN. Ueber die Bildung gepaarter Glukuronsäuren in der Leber. *Beitrag. z. Chem. Physiol.*, **2**, 591, 1903.

(82) VAN LEERSUM. Gepaarter Glukuronsäuren als Bestandtheile der Galle. *Beitrag. z. Chem. Physiol.*, **3**, 522, 1903.

(83) VAN LEERSUM. Die Vernendbarkeit der Orcinprobe von Bial zum Nachweiss der Glukuronsäure. *Beitrag. z. Chem. Physiol.*, **5**, 510, 1904.

1° ACTION DE LA BOUILLIE DE FOIE SUR L'INDOL

HERTER et WAKEMAN (84), les premiers, ont trituré de l'indol avec des bouillies d'organes divers (foie, sang, rein, muscles, cerveau) et ont remarqué qu'au bout de quelque temps ce corps ne se laisse plus récupérer par distillation.

La bouillie de foie est particulièrement active. Il ne s'agit, en aucune façon, d'un phénomène dû à la vitalité des cellules, car la fixation d'indol se fait en présence du sublimé, d'acide sulfurique, d'azotate d'argent ou bien encore, après que le tissu a été chauffé à 130°.

Nous avons essayé de voir si l'indol, en présence de pulpe hépatique broyée ou de sang, à la température ordinaire ou à celle de l'étuve à 37°, pouvait se transformer en indoxyle. Nos essais ont été infructueux.

Toutefois, contrairement à ce qu'avancent HERTER et WAKEMAN, nous avons pu extraire l'indol de la pulpe du foie avec laquelle il avait été mis en contact. Le résultat, négatif à ce point de vue, de ces auteurs, est peut-être dû à la très faible quantité d'indol mise en expérience, d'où la difficulté qu'ils ont rencontrée à décélérer ce corps dans le distillat.

2° CIRCULATION ARTIFICIELLE DANS LE FOIE RESTÉ EN PLACE

Nous avons opéré sur un chien de taille moyenne. Après laparotomie et ouverture de la cage thoracique, on ligature la veine cave supérieure et on place deux canules, l'une sur la veine porte, l'autre sur la veine cave, après l'abouchement des veines sus-hépatiques.

A la première, on fixe un tube en caoutchouc de 1 mètre de longueur, disposé verticalement et muni d'un entonnoir.

Auparavant, on avait recueilli sur un autre chien du sang que l'on défibrinait ensuite et qu'on maintenait à l'étuve à 40°. Ce sang défibriné était additionné d'une petite quantité d'une solution

(84) HERTER et WAKEMAN. The action of hepatic, renal and other cells on phenol and indol under normal and pathological conditions. *Journ. of experim. Medic.*, 4, 307, 1899.

d'indol (indol : 0 gr. 40, eau : 100 gr., alcool : 8 cc.). On plaçait ce sang dans l'entonnoir et on le recueillait à sa sortie du foie, puis on le reversait dans l'entonnoir ; l'opération durait une heure. La vitesse du sang était réglée en abaissant ou en élevant l'entonnoir fixé à un support. La température du sang était maintenue autour de 38° à 39°. L'expérience terminée, le sang était recueilli pour la recherche, soit de l'indoxyle conjugué, soit de l'indol.

a) *Recherche de l'indoxyle conjugué.* — Le sang, étendu d'eau, est coagulé par la chaleur en présence de quelques gouttes d'acide acétique ; après refroidissement et filtration, on défèque la portion liquide avec l'acétate neutre de plomb. Le filtrat concentré, additionné de son volume d'isatine chlorhydrique, est porté au bain-marie pendant un quart d'heure ; la recherche de l'indirubine reste négative.

b) *Recherche de l'indol.* — Le sang, étendu d'eau, est agité lentement avec une petite quantité de benzène pur, dans un entonnoir à décantation. Par le repos, le benzène se rassemblait à la surface en un liquide laiteux, formant une véritable émulsion.

Après soutirage, centrifugation et filtration, nous étions en possession d'une liqueur benzénique limpide, exempte d'eau et d'albumine ; elle renfermait l'indol mis en expérience, ainsi que nous l'ont prouvé les réactions caractéristiques obtenues.

3° ABLATION DU FOIE CHEZ LA GRENOUILLE

Nous avons choisi la grenouille, car ce batracien résiste très bien à tous les traumatismes et en particulier à l'ablation du foie.

Toutes nos recherches ont été faites sur des grenouilles d'hiver.

BAUMANN, ayant placé vingt grenouilles d'été dans trois quarts de litre d'eau renouvelée tous les jours et dont la quantité totale fut ramenée pour l'expérience à 30 cc., a trouvé dans l'urine recueillie par ce procédé indirect un peu d'éthers sulfuriques. La réaction de l'indican fut négative et, par la distillation en présence d'acide chlorhydrique, il n'obtint pas de phénol.

CHRISTIANI (85) établit que l'indol administré à la grenouille

(85) CHRISTIANI. Ueber das Verhalten von Benzol, Phenol und Indol im Thierkörper. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 2, 273, 1872.

s'élimine sous la forme d'éthers sulfuriques. Nous nous sommes assuré, par le procédé de BAUMANN-SALKOWSKI, que l'urine normale de nos grenouilles contenait, à côté des sulfates, des traces évidentes d'éthers sulfuriques, mais nous n'avons pu y déceler le phénol.

Chez les animaux qu'on venait d'apporter au laboratoire, l'urine était peu abondante, colorée en jaune: aussi, dans le but d'augmenter la sécrétion, avons nous réalisé les conditions suivantes: chaque grenouille isolée est placée dans un récipient en verre avec une petite éponge humectée. Une fois par jour, éponges et récipients sont lavés avec soin et les grenouilles portées rapidement à deux ou trois reprises sous un courant d'eau; l'animal déglutit alors un peu de liquide. Ce moyen très simple suffit à augmenter convenablement la sécrétion de l'urine. Celle-ci est d'un jaune pâle, parfois incolore, avec une sorte de reflet jaunâtre.

Récolte de l'urine. — Elle est faite par cathétérisme du cloaque. La grenouille saisie avec précaution est immobilisée dans une main. Une canule à saignée est introduite par l'orifice cloacal et pénètre directement dans la vessie; l'urine qui s'écoule avec une vitesse variable tombe dans une éprouvette graduée.

En général, nous pratiquions plusieurs sondages par jour sur les animaux de chaque série et les réactions étaient faites sur une partie de la totalité de l'urine ainsi recueillie. Quand l'urine devait être récoltée, on vidait préalablement, après le lavage du soir, la vessie de son contenu et l'urine était recueillie dans la journée du lendemain. La même manœuvre était répétée chaque soir, lorsqu'on devait recueillir l'urine pendant plusieurs jours successivement.

La recherche des chromogènes indoxyliques a été effectuée par la méthode à l'isatine chlorhydrique et par celle aux oxydants (voir plus loin).

Avant toute expérimentation, il était indiqué de rechercher si l'urine de la grenouille d'hiver normale contenait des chromogènes indoxyliques.

Dans ce but, nous avons employé:

- a) Des grenouilles qu'on venait d'apporter au laboratoire;
- b) Des grenouilles à jeun, au laboratoire depuis trois mois;

c) Des grenouilles ayant subi les manipulations décrites plus haut, destinées à augmenter leur sécrétion urinaire.

Les résultats, en ce qui concerne les chromogènes indoxyliques, ont été le plus souvent nuls : quelquefois, nous avons trouvé, dans l'urine, des traces de chromogène scatolique.

Expériences avec l'indol : Les animaux utilisés pour ces recherches avaient tous subi, depuis huit jours, le traitement préparatoire destiné à favoriser leur sécrétion urinaire. Pendant toute la durée de l'expérience, on continue à les laver régulièrement, ainsi que leurs récipients et les accessoires.

L'indol était constamment donné en injections ; la liqueur utilisée s'obtient en dissolvant 10 centigrammes d'indol dans 8 cc. d'alcool à 95° et 92 cc. d'eau distillée.

Chaque injection, rigoureusement de 1 cc. de cette solution qui correspondait à 1 milligramme d'indol, était faite dans les sacs lymphatiques dorsaux.

L'indol injecté à des grenouilles normales, ne présentant pas antérieurement de chromogènes urinaires, passe dans l'urine sous la forme de conjugués indoxyliques.

Douze grenouilles ont d'abord donné, par deux sondages, 9 cc. d'urine ne renfermant ni chromogènes scatoliques, ni conjugués indoxyliques. Ces douze animaux reçoivent, chacun dans les sacs lymphatiques dorsaux, 1 milligramme d'indol.

La quantité d'urine recueillie le lendemain s'élevait à 40 cc. L'isatine chlorhydrique provoque la formation d'indirubine, qui ne tarde pas à précipiter partiellement en flocons.

Effet de l'extirpation du gros intestin : Le gros intestin a-t-il un rôle important dans la transformation de l'indol en dérivés indoxyliques ? C'est ce que doit nous révéler son exérèse.

Sur six grenouilles, nous avons réséqué le gros intestin jusqu'au cloaque. Deux doubles ligatures sont placées à chaque extrémité de l'organe ; une ligature simple intercepte le mésentère correspondant très près de l'intestin ; ce dernier est détaché aux ciseaux par section entre les doubles ligatures, puis le long de son bord mésentérique.

La quantité d'urine recueillie deux jours après, par un sondage, s'est élevée à 4 cc.

Ces animaux reçoivent chacun 1 milligramme d'indol dans les sacs lymphatiques dorsaux. La quantité d'urine recueillie le lendemain s'élevait à 4 cc., et l'isatine chlorhydrique y a produit de l'indirubine qui a floculé partiellement par refroidissement.

Effet de la résection de la totalité du tube digestif : Sur cinq grenouilles, nous avons réséqué, sur toute la longueur, le tractus stomaco-intestinal, depuis le pharynx jusqu'au cloaque. Les diverses ligatures des vaisseaux mésentériques et gastriques doivent être faites avec le plus grand soin, dans le but de ménager l'artère hépatique. Les animaux opérés ont alors reçu chaque soir, dans les sacs lymphatiques dorsaux, 1 cc. de sérum physiologique ; la quantité d'urine recueillie le troisième jour s'élevait à 4 cc. 5.

Le quatrième jour, chaque grenouille recevait 1 cc. de la solution d'indol, soit 1 milligramme de ce dernier. Le lendemain, on a recueilli, par deux sondages, 5 cc. d'urine, laquelle, par l'isatine chlorhydrique, fournissait de l'indirubine ne tardant pas à flocler par refroidissement.

Effet de l'ablation du foie : Nos expériences d'extirpation du foie ont été pratiquées sur des animaux qui avaient subi l'évidement du gros intestin.

On isole tout d'abord, par des ligatures à leur base, le lobe droit et les deux portions du lobe gauche. Sur ce dernier, il faut éviter avec soin la veine cave, qui passe très près de sa base, dans le lobe médian. Aussitôt on cautérise minutieusement, d'une part, les très minimes parties restantes des lobes droit et gauche, ainsi que la totalité du lobe médian, à droite et à gauche, en descendant le long de la veine cave. Sur le sinus hépato-cave lui-même se trouve, sur la gauche de la ligne médiane, un petit lobule hépatique qu'on ne voit bien qu'en tirant le foie vers la droite, et qu'il convient de cautériser en tout premier lieu, en se servant comme tracteurs des ligatures qui sont à la base des gros blocs hépatiques, avant même de sectionner ceux-ci. Si l'opération a été bien conduite, il est facile de s'assurer qu'il n'existe plus que des traces infimes de substance hépatique, absolument dépourvues de vascularisation et totalement brûlées par le thermo-cautère.

Le surlendemain de l'opération, on récolte les urines pour la

recherche préliminaire des chromogènes. Ces urines sont un peu brunes, très rarement saignantes, et bientôt reviennent à une coloration voisine de la normale. Le même jour on injecte l'indol.

La quantité de chromogène formée ne saurait être mesurée exactement; toutefois, en traitant rigoureusement de façon identique une certaine quantité d'urine de grenouilles privées de foie et injectées d'indol et la même quantité d'urine du même nombre de grenouilles dépourvues de gros intestin et également injectées d'indol, on possède un étalon suffisant pour apprécier à la vue la différence considérable qui sépare les résultats fournis par l'une et l'autre catégorie d'animaux: l'urine des grenouilles ayant leur foie donne, par l'isatine chlorhydrique, un précipité d'indirubine; celle des grenouilles privées de foie, après le même traitement, colore le chloroforme en rose plus ou moins pâle, parfois à peine sensible.

Les expériences sont résumées dans le tableau suivant:

APRÈS L'ABLATION DU FOIE													
Expériences	AVANT L'INJECTION						APRÈS L'INJECTION						
	Nombre de grenouilles	Sondages par jour	Quantité d'urine	Urée p. 1,000	Chromogène indoxylrique	Chromogène scatolique	Indol injecté	1 ^{er} JOUR		2 ^e JOUR		3 ^e JOUR	
								Quantité d'urine	Chromogène indoxylrique	Quantité d'urine	Chromogène indoxylrique	Quantité d'urine	Chromogène indoxylrique
1	3	1	1 ^{cc} ,2	»	0*	0	1 ^{mmg}	1 ^{cc}	traces	1 ^{cc}	traces	1 ^{cc} 1,2	traces
2	4	1	1 ^{cc}	»	0	0	1 ^{mmg}	1 ^{cc} ,8	0	1 ^{cc} ,2	traces	»	»
3	5	1	1 ^{cc} ,6	»	0	0	1 ^{mmg}	2 ^{cc}	0	4 ^{cc}	traces	»	»
4	6	2	3 ^{cc} ,3	1 ^{gr} ,5	0	0	1 ^{mmg}	4 ^{cc}	traces	3 ^{cc} ,5	traces	»	»

* Le chiffre 0 pour les chromogènes indique une réaction absolument négative.

* Le chiffre 0 pour les chromogènes indique une réaction absolument négative.

Remarque: Dans l'expérience 1, l'excrétion de chromogène indoxylrique n'augmentait nullement avec le temps. Dans l'expérience 4, la diminution, le deuxième jour par rapport au premier, était particulièrement sensible.

Nous nous sommes demandé ce que devenait l'indol injecté chez les grenouilles privées de foie. Passait-il dans l'urine? Dans les expériences 1 et 2, nous avons obtenu, avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde et l'acide chlorhydrique, un petit anneau rouge, mais la réaction doit rester douteuse puisqu'elle a été effectuée sur l'urine totale, qui contenait un peu d'indican. Dans l'expérience 3, nous avons observé, le premier jour, sur l'urine totale mais dépourvue d'indican, un anneau indolique net, peu intense. Dans l'expérience 4, malgré une extraction au benzène, nous n'avons pu déceler d'indol avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde.

De ces expériences sur la grenouille nous tirerons la conclusion suivante :

Chez l'animal vivant le foie a la plus grande part dans la transformation de l'indol en chromogènes urinaires indoxyliques.

Quels autres organes peuvent encore intervenir dans cette transformation? C'est ce que nous n'avons pas encore pu déterminer.

L'ablation du foie chez un animal d'organisation plus complexe que celle de la grenouille donnerait à n'en pas douter des résultats fort intéressants, mais cette opération est des plus difficiles à mener à bien si l'on veut s'assurer une survie suffisante.

MINKOWSKI (87, 88) l'avait réalisée chez le canard pour l'étude de la fonction uropoïétique du foie. Nous n'avons pas été aussi heureux que lui et devant nos nombreux succès, au cours desquels nous n'avons pu obtenir qu'une survie d'une heure et quart — et encore quelle survie — nous avons abandonné la partie. Dans l'impossibilité opératoire où nous nous sommes trouvé d'extirper le foie chez les animaux supérieurs, nous avons pensé à léser la cellule hépatique elle-même au moyen du phosphore.

L'emploi des hépato-toxines était fort séduisant, mais si leur préparation n'est pas difficile, l'obtention de résultats bien satisfaisants est souvent une question de chance.

Nous avons donc fait prendre à un chien de l'huile phosphorée.

Cette expérience n'est certainement pas à l'abri de la critique,

(87) MINKOWSKI. Ueber den Einfluss der Leberextirpation auf den Stoffwechsel. *Arch. f. experiment. Pathol. u. Pharm.*, **21**, 44, 1886..

(88) MINKOWSKI. Ueber die Ursachen der Milchsäure ausscheidung nach der Leberextirpation. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak.*, **31**, 214, 1893.

mais elle n'en a pas moins à notre sens une valeur qui n'est pas négligeable.

Prenons, en effet, un animal qui meurt avec une dégénérescence graisseuse profonde et totale du foie, et que l'on peut dire, par conséquent, atteint — au sens clinique du mot — d'une insuffisance hépatique.

Or, avec une telle lésion, qui doit comporter cependant l'arrêt d'un certain nombre de fonctions, l'animal a pu recevoir 1 gramme d'indol et éliminer une proportion telle de chromogènes indoxyliques, que l'on a constaté le phénomène de l'indigurie.

Le phosphore n'a donc pas frappé le foie au point de lui enlever la faculté de transformer une quantité d'indol autrement élevée que celle qui lui parviendrait dans les conditions ordinaires de l'alimentation physiologique,

S'il y avait eu insuffisance hépatique vraie, le foie n'aurait pas pu fixer l'indol et le manipuler; celui-ci se serait retrouvé pour la plus grande partie dans l'urine, et ce n'est qu'une faible proportion qui aurait été transformée en indican par les organes autres que le foie, si tant est que notre conclusion tirée de nos expériences sur la grenouille puisse s'appliquer au chien.

Quoi qu'il en soit, lorsque dans la médecine de l'homme on tient à faire jouer à l'insuffisance hépatique un rôle majeur pour expliquer les variations des chromogènes indoxyliques de l'urine, cela nous paraît excessif.

Un foie en dégénérescence graisseuse qui reçoit d'un seul coup 1 gramme d'indol et le manipule, pourra *a fortiori* exercer ses fonctions transformatrices quand il ne s'agira que de milligrammes de ce corps.

Il ne convient donc pas de parler d'insuffisance hépatique dans cet ordre d'idées. Si malade que soit un foie, si réduit que soit son volume ou ses fonctions, il y aura toujours assez de cellules hépatiques pour transformer les quelques milligrammes, voire même les quelques centigrammes d'indol que l'intestin lui enverra.

CHROMOGÈNES URINAIRES

DÉRIVÉS DE L'INDOL

Moyens d'en déceler l'indoxyle.

Nous rappellerons que l'indol formé normalement dans l'intestin ou administré expérimentalement, soit sous la peau, soit par la bouche, se retrouve dans l'urine sous la forme de dérivés conjugués de l'indoxyle, l'éther sulfurique ou indican et le dérivé glycuronique. Nous ferons abstraction, pour l'instant, de la nature du radical acide lié à l'indoxyle et nous n'étudierons dans ce chapitre que les réactions capables de déceler l'existence de ce dernier; elles sont d'ailleurs les mêmes, quelle que soit la nature du dérivé indoxylrique.

Les méthodes employées pour déceler les chromogènes indoxylriques dans l'urine sont toutes basées sur les propriétés que possède l'indoxyle de fournir, soit du bleu d'indigo, soit des indogénides.

L'indoxyle est généralement mis en liberté de ses chromogènes par l'action de l'acide chlorhydrique fort; quelquefois on se sert d'acide sulfurique.

Formation d'indigotine.

En principe, la transformation de l'indoxyle en indigotine est réalisée par un agent d'oxydation quelconque. Pour cette raison, les divers procédés que nous allons décrire se rattachent à la méthode dite *aux oxydants*.

Les agents oxydants les plus fréquemment employés ont été ou sont :

Les hypochlorites alcalins,
Le chlorure ferrique,
Les persulfates alcalins,
Le permanganate de potassium,
L'acide azotique,
L'eau oxygénée,
L'oxygène.

Tous ne sont pas également recommandables, aussi faut-il faire un choix judicieux, certains d'entre eux agissant trop violemment et poussant l'oxydation jusqu'à dépasser le stade indigo. C'est là un reproche grave que l'on peut d'ailleurs adresser d'une façon générale à la méthode aux oxydants.

Dans ces conditions, l'oxydation excessive conduit au terme *isatine*, quand elle ne va pas encore plus loin.

Cette action trop énergique de l'oxydant est des plus préjudiciables lorsqu'on tente de faire un dosage de l'indigo formé. Mais ces inconvénients ne se rencontrent plus quand, au lieu d'employer la méthode aux oxydants, on utilise celle des indogénides.

MÉTHODE AUX OXYDANTS

Tous les procédés basés sur cette méthode fournissent en réalité un mélange d'indigotine et d'indirubine dont les proportions relatives varient avec l'oxydant et les conditions de son emploi.

Le premier oxydant employé pour déceler l'indigo dans les urines fut l'hypochlorite de chaux ou eau de Javel. Il fut recommandé par JAFFÉ (89) en 1870 et servit plus tard à MASSON (90).

Le permanganate de potassium à 1/200 fut préconisé par SENATOR (71) en 1877.

Ces deux réactifs agissent trop violemment et donnent beaucoup d'isatine.

Il peut même arriver que dans des urines contenant très peu de conjugués indoxyliques, l'indoxyle mis en liberté par l'acide

(89) JAFFÉ. Ueber Ursprung des Indikans im Harn. *Centrabl. für Medic. Wissench.*, 1, 2, 1872.

(90) MASSON. Des matières colorantes du groupe de l'indigo considérées au point de vue physiologique. *Archiv. de Physiol.*, 1, 938, 1874.

chlorhydrique et même l'indigo qui est produit tout au début, soient entièrement transformés en isatine. Ce ne sera donc que lorsqu'on aura affaire à des urines riches en chromogènes que les oxydants en question ne détruiront pas tout l'indigo formé. Nous ajouterons que le permanganate de potassium en solution acide décolore l'indigo, puisqu'il existe un mode de dosage de celui-ci basé justement sur cette propriété.

OBERMAYER (91), en 1890, a préconisé le chlorure ferrique recommandé antérieurement par BAUMANN et TIEMANN (60). Cet auteur emploie de l'acide chlorhydrique fumant dans lequel il dissout 4 grammes de perchlorure de fer par litre et mélange volumes égaux d'urine et de ce réactif. En agitant le mélange, le liquide se colore en vert, puis en vert bleu dû à la formation d'indigotine que l'on extrait au moyen du chloroforme.

Ce procédé donne surtout du bleu. Selon BOUMA (92), il ne fournirait pas d'isatine par oxydation de l'indigo; mais pour MAILLARD (93), il s'en formerait toujours une petite quantité.

Selon nous, le procédé d'OBERMAYER convient bien pour la recherche de l'indican dans les urines.

Les persulfates alcalins ont été recommandés par AMANN (94) en 1897, par KLETT (95) en 1900 et ROSSI (96) en 1907.

On ajoute à l'urine de l'acide sulfurique et quelques gouttes d'une solution aqueuse d'un persulfate alcalin, puis on agite avec du chloroforme qui se colore en bleu.

LOUBIOU (97) utilise l'eau oxygénée. Nous nous en servons égale-

(91) OBERMAYER. Ueber eine Modification der Indicanprobe. *Wien. Klin. Wochenschr.*, n° 9, 176, 1890.

(92) BOUMA. Nachtrag zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. *Zeitschr. für physiol. chem.*, **39**, 356, 1903.

(93) L. MAILLARD. *L'indoxyde urinaire et les couleurs qui en dérivent*. Thèse méd., Nancy. Schleicher, Paris, 1903.

(94) AMANN. Bestimmung des Indikans im Harn. *Chemisch. Centrabl.*, **1**, 152, 1898.

(95) KLETT. Nachweis von Indican im pathologischen Harn. *Chemiker Zeitung*, **24**, 690, 1900.

(96) ROSSI. Neuer Nachweis von Indikan im Harn mit Alkalipersulfaten. *Gazetta chim. ital.*, **36**, 887, 1907.

(97) LOUBIOU. Neues Verfahren zum Nachweis des Indikans im Harn. *Chemisch. Centrabl.*, **1**, 620, 1897.

ment depuis longtemps, et nous lui accordons notre préférence, car elle constitue un réactif très maniable.

On mélange volumes égaux d'urine et d'acide chlorhydrique fumant, puis autant de gouttes d'eau oxygénée diluée que de centimètres cubes d'urine. Nous employons l'eau oxygénée commerciale à 10—12 volumes, diluée de dix fois son volume d'eau, ce qui fait de l'eau oxygénée à environ 1 volume.

Plus récemment, STRYZOWSKI (98) a employé le chlorate de potassium, mais cet oxydant est à rejeter, car en présence d'acides, il dégage du chlore et détruit l'indigo formé, partiellement s'il y en a beaucoup, totalement s'il y en a peu.

Enfin MAILLARD (99) recommande l'oxygène de l'air ; ici il n'y a certes pas à craindre une suroxydation en isatine, mais la transformation en matières indigotiques est très lente ; elle donne, au début, surtout de l'indigotine et à la fin, surtout de l'indirubine. Quoi qu'il en soit, lorsqu'on juge l'oxydation terminée, le chloroforme qui rassemble les couleurs indigotiques est plutôt violacé ou rouge violacé ; il n'a pas cette belle teinte bleue qu'il prend avec la même urine traitée par le réactif d'OBERMAYER.

Les inconvénients que l'on peut adresser aux divers procédés de la méthode aux oxydants sont de deux sortes :

1^o L'oxydant, quand il n'est pas manié avec précaution, attaque une partie de l'indoxyle mis en liberté et va même jusqu'à détruire l'indigo nouvellement formé, lequel, étant à l'état naissant, peut-on dire, est beaucoup plus sensible à l'action des oxydants que l'indigo industriel ou l'indigo cristallisé retiré d'urines traitées antérieurement.

Il arrive en effet que l'addition exagérée de l'oxydant — après mélange à volumes égaux de l'urine et d'acide chlorhydrique — qu'il s'agisse d'hypochlorite, d'eau oxygénée, de persulfate, etc., amène la décoloration de la liqueur qui s'était d'abord teintée en bleu violacé. Nous dirons qu'il y a même un procédé de dosage

(98) STRYZOWSKI. Einiges über Harnindikan zur Kritik der quantitativen Bestimmungsmethoden dieses Körpers nebst einem Nachweis desselben. *chemisch. Centralbl.*, n° 2, 1181, 1901.

(99) L. MAILLARD. *L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent*. Paris, Schleicher, 1903.

clinique de l'indigo urinaire basé sur cette propriété. On détermine le nombre de gouttes d'une solution convenable d'hypochlorite alcalin qu'il faut pour amener la décoloration d'une urine additionnée de son volume d'acide chlorhydrique, urine dans laquelle les premières gouttes d'hypochlorite avaient amené la formation de l'indigo que les gouttes ultérieures doivent détruire.

Ce procédé, dont la description se trouve dans la plupart des livres d'urologie ou dans de nombreux travaux qui parlent de l'indican urinaire, ne peut que donner des résultats très approximatifs, et par suite très critiquables. Nous ne saurions en recommander l'emploi qui donnerait lieu à de grosses erreurs.

Mais si les oxydants mal employés amènent la destruction partielle ou totale des couleurs indigotiques dont ils doivent déterminer la formation, on peut se demander — car il ne s'agit là que d'une question de limites — s'il peut y avoir suroxydation et destruction de l'indigo, même en se servant des oxydants avec précaution.

De nombreuses discussions se sont élevées à ce sujet. BOUMA (100) nie la formation d'isatine en se servant du réactif au chlorure ferrique d'OBERMAYER; MAILLARD, au contraire, en affirme l'existence (93).

Les auteurs qui voudraient nier ou affirmer la suroxydation de l'indigo en ne se basant que sur les chiffres fournis par les dosages de ce dernier — alors qu'on a opéré sur la même urine, mais dans des conditions différentes — risqueraient de se tromper; car, nous ne craignons pas de l'avancer, les difficultés du dosage de l'indigo sont telles, qu'il est malaisé d'en interpréter les résultats, leur sens et leur valeur.

Il est plus légitime de chercher à décèler l'isatine qui doit se former dans la suroxydation de l'indigo.

La recherche de l'isatine est basée sur la propriété que ce composé a de donner, en présence du thiophène et de l'acide sulfurique concentré, une belle coloration bleue; limite de sensibilité est de 1/100 de milligramme. C'est la réaction dite de *l'indophénine*.

(100) BOUMA. Nachtrag zur Metodik der Harnindikan im Harn. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* **39**, 336, 1903.

BAEYER (101, 102), la donna tout d'abord comme caractéristique du benzène, mais par la suite MEYER (103) montra qu'elle est attribuable au thiophène que contient toujours le benzène commercial (tel celui qui n'a pas été soigneusement purifié par la méthode de HALLER au AlCl_3); BAEYER se rangea à son avis.

L'isatine est dissoute à l'aide de quelques gouttes de benzène ordinaire, ou mieux de benzène contenant 1 % de thiophène, dans une petite capsule de porcelaine, puis on verse une ou deux gouttes d'acide sulfurique concentré; au contact de l'acide et de l'extrait benzénique, il se développe une belle coloration bleue très foncée, particulièrement perceptible sur le bord de la capsule, lorsqu'on a homogénéisé le mélange.

On peut encore dissoudre l'isatine dans SO^{II}_2 pur, puis ajouter le benzène. Mais le procédé qui précède est préférable, et c'est celui que recommande BOUMA.

2° Le second inconvénient que l'on peut reprocher à la méthode aux oxydants est qu'elle conduit toujours à un mélange de bleu et de rouge d'indigo, dont les proportions relatives varient avec la même urine, suivant (comme nous le verrons plus loin) les conditions dans lesquelles on opère, et souvent même, on ne sait pas trop pourquoi.

Tantôt c'est le bleu qui prédomine, tantôt le rouge; aussi les teintes du chloroforme sont-elles très variables, allant du bleu de France au rouge légèrement violacé.

Même lorsque le chloroforme nous paraît très bleu, comme c'est le cas quand on emploie le réactif d'OBERMAYER, il y a toujours formation d'un peu d'indirubine.

Le phénomène est encore beaucoup plus net quand on se sert des autres procédés d'oxydation, car ceux-ci donnent plus de rouge encore que celui d'OBERMAYER.

Pour constater la présence du rouge d'indigo en face du bleu, rien n'est plus simple: On agite la liqueur aqueuse avec de l'éther; l'éther s'empare du bleu et du rouge, mais alors que le rouge s'y

(101) BAEYER. Ueber die Gruppe des Indigoblaus. *Berichte*, **12**, 1311 1879.

(102) BAEYER. Ueber die Verbindungen der Indigogruppe. *Berichte*, **16**, 2188, 1883.

(103) V. MEYER. *Die Thiophengruppe*. Brunswick, 1887.

dissout facilement, le bleu — simplement entraîné par un phénomène physique de surface, dans lequel doivent intervenir des variations de tension superficielle — se sépare immédiatement de l'éther et vient se déposer sur les parois. Il suffit alors d'incliner avec précaution le tube pour constater, en effet, que l'éther possède une belle coloration rouge, pure de toute race de bleu; l'indigotine est restée collée aux parois.

La matière colorante bleue qui se forme dans l'urine chlorhydrique ne serait pas identique à l'indigotine. Pour MAILLARD, elle s'en différencierait par plusieurs caractères, notamment sa grande solubilité dans le chloroforme et la faculté qu'elle posséderait de se polymériser : MAILLARD désigne cette substance sous le nom d'*hémindigotine*.

Nous verrons plus loin ce qu'il faut penser de cette conception.

Toutes les fois donc, que l'on traite une urine par son volume d'acide chlorhydrique et par un oxydant, il se forme à côté du bleu d'indigo, des substances rouges dont l'indirubine est la principale. Mais ce n'est pas tout, et l'on peut constater aussi la présence de substances *brunes*, dont nous n'avons pas encore parlé.

Pour WANG (104, 105), ces dernières étaient des impuretés, dont il fallait débarrasser le bleu d'indigo par un lavage à l'alcool et à l'éther; pour BOUMA (106), au contraire, ces prétendues impuretés ne devaient pas être séparées de l'indigo bleu, car elles faisaient avec lui partie du même groupe. Dans ces conditions, on conçoit qu'un dosage colorimétrique du bleu d'indigo ne peut pas donner de résultats exacts; il faudrait y comprendre le rouge et le brun que WANG rejetait comme impuretés.

La discussion était donc ouverte sur la question de l'unité d'origine du bleu, du rouge et du brun de l'urine, unité admise par

(104) WANG. Ueber die rothbraune Farbstoffe bei der quantitative Bestimmung des Harnindikans. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **28**, 576, 1899.

(105) WANG. Weiteres über die quantitative Bestimmung des Harnindikans. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **27**, 185, 1899.

(106) BOUMA. Ueber die quantitative Bestimmung des Harnindikans nach Wang-Bouma. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **27**, 348, 1900.

BOUMA dans un premier mémoire, et rejetée par lui, à tort selon nous, dans un deuxième (107).

Deux raisons militent en sa faveur :

1^o Toutes les méthodes d'extraction du bleu d'indigo urinaire aboutissent à la formation de rouge ;

2^o On observe, ainsi que nous l'avons déjà dit, qu'avec une même liqueur on obtient des quantités variables de bleu et de rouge suivant la technique employée.

Dans ce cas, deux hypothèses sont en présence :

1^o Ou une couleur se transforme en l'autre ;

2^o Ou l'indoxyle mis en liberté par l'acide chlorhydrique est capable de fournir indifféremment du bleu ou du rouge, les proportions de ces deux couleurs ne pouvant dépendre que des conditions dans lesquelles on opère, sans qu'il y ait transformation d'une couleur en l'autre.

La première hypothèse a fait l'objet de développements fort intéressants de MAILLARD, qui a montré qu'on pouvait remplacer intégralement le bleu par le rouge, suivant les conditions de la réaction (108).

Les premiers faits (109) que nous avons observés en 1903 sur les urines de cheval, de chien, de vache et de chèvre semblaient corroborer ceux que MAILLARD avait avancés en ce qui concerne la transformation du bleu d'indigo en rouge ; mais depuis, nous avons reconnu que celle-ci n'est pas constante.

Nous avons surtout opéré, en 1903, avec l'urine du cheval, d'abord, parce qu'il nous était facile de nous en procurer de grandes quantités, ensuite parce que cette urine est très riche en indican ; mais nos observations avaient également porté sur le chien et aussi sur l'homme.

Nous avons remarqué, après MAILLARD, que l'indoxyle mis en

(107) BOUMA. Ueber die bei der Behandlung des Harnindikans mit Ferrichloridsäure aufstehenden rothbraunen Farbstoffe. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **30**, 117, 1900.

(108) MAILLARD. Sur l'état polymérisé de l'indigotine ordinaire et la transformation isomérique de l'indigotine en indirubine. *C. R. Acad. Scienc.*, **134**, 470, 1902.

(109) PORCHER et HERVIEUX. Note sur l'indoxyle urinaire. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 862, 1903.

liberté est loin de fournir toujours le même produit final et que le terme de la réaction diffère avec la façon dont se poursuit l'oxydation qui transforme l'indoxyle en couleurs indigotiques.

Voici le manuel opératoire que nous suivions pour bien mettre ce fait en évidence :

Une urine normale de cheval, particulièrement riche en indican est déféquée par 1/10 d'extrait de Saturne et l'excès de plomb est enlevé soit par H^2S , soit par le sulfate de soude.

Dans une série de tubes à essais, on verse 5 cc. d'urine déféquée et 5 cc. d'acide chlorhydrique; on laisse en contact urine et acide : dans le premier (*a*) une minute; dans le deuxième (*b*), deux minutes; dans le troisième (*c*), cinq minutes; dans le quatrième (*d*), quinze minutes; dans le cinquième (*e*), trente minutes, et dans le sixième (*f*) une heure. — Au bout de ces temps, on ajoute dans chaque tube 5 gouttes d'eau oxygénée, on agite vivement pendant cinq minutes et on verse ensuite 5 cc. de chloroforme dans lequel on rassemble l'indigo formé.

Voici ce que nous avons observé :

a et b), *contact de l'urine et de l'acide pendant une et deux minutes* : les résultats sont identiques, le chloroforme prend une belle teinte bleue et la coloration rosée du liquide surnageant est très faible.

c) *Contact de cinq minutes* : La couleur du chloroforme tire déjà un peu sur le violet, elle est bleu violacé et la liqueur surnageante est plus rose qu'en *a* et qu'en *b*.

d) *Contact de quinze minutes* : Le chloroforme a une teinte lilas franchement violette.

e et f) *Contact de trente minutes et d'une heure* : La couleur du chloroforme est rouge violacé pour ces deux tubes, pendant que la liqueur surnageante est nettement rose.

De cette première série d'expériences nous avons conclu qu'il suffit de faire agir l'acide chlorhydrique pendant deux minutes tout au plus, puis d'ajouter l'eau oxygénée, d'agiter vivement et cinq minutes après de rassembler dans le chloroforme.

Mais nous avons modifié par la suite ce *modus faciendi*, et l'expérience nous ayant montré que les réactions qui aboutissent à la formation d'indigo bleu : dédoublement de l'indican et oxydation

ultérieure de l'indoxyle, étaient très rapides, nous opérons maintenant de la façon suivante :

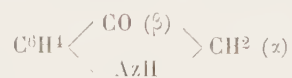
Nous ajoutons dans un entonnoir à décantation simultanément : urine déféquée, acide chlorhydrique, eau oxygénée, chloroforme, dans les proportions indiquées plus haut (1 cc. d'urine; 1 cc. d'acide chlorhydrique; 1 cc. de chloroforme; 1 goutte d'eau oxygénée diluée), et on agite énergiquement le tout. Dans ces conditions l'indigo, à mesure qu'il est formé, passe dans le chloroforme et échappe ainsi à l'action ultérieure de l'acide chlorhydrique et de l'eau oxygénée; le chloroforme prend alors une belle teinte bleue et la liqueur urinaire surnageante est décolorée ou ne possède, si on l'examine sous une grande épaisseur, qu'une très faible teinte rougeâtre.

Nous pensons qu'en opérant ainsi qu'il vient d'être dit, tout l'indoxyle urinaire est passé à l'état de bleu d'indigo, d'indigotine, et qu'il n'a dû se faire que des traces négligeables de rouge ou de brun d'indigo, car nous avons échappé à la condition principale de formation du rouge d'indigo, qui est le contact prolongé de l'acide et de l'indigo bleu urinaire. Pour assurer à celui-ci toute stabilité, il ne restera donc qu'à le débarrasser rapidement de la présence de la petite quantité d'acide chlorhydrique et d'oxydant dissous dans le chloroforme.

MÉTHODE DES INDOGÉNIDES

La théorie des indogénides imaginée par BAEYER lui servit à établir la constitution des couleurs indigotiques.

Pour cet auteur, l'indoxyle mis en liberté de ses éthers réagirait sous la forme de pseudo-indoxyle :



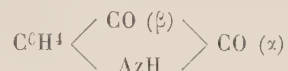
qui posséderait un CO cétonique au lieu de la fonction énolique $=\text{C} - \text{OH}$ de l'indoxyle.

Ce pseudo-indoxyle réagit aisément avec les aldéhydes et les cétones pour donner des indogénides après départ d'une molécule d'eau. Nous n'étudierons ici que deux de ces combinaisons,

parce qu'elles sont susceptibles d'être fréquemment employées en chimie physiologique :

- 1^o Indogénide de l'isatine;
- 2^o Indogénide du furfurol.

Indogénide de l'isatine : Théoriquement, l'indoxyle en présence d'une molécule d'isatine, peut s'y combiner avec élimination d'une molécule d'eau de deux façons différentes, suivant que le carbone α du pseudo-indoxyle se relie au carbone α ou β de l'isatine :



L'isatine fournirait donc deux indogénides : l'indogénide α qui sera l'indigotine, l'indogénide β qui serait l'indirubine, mais en réalité, on n'obtient jamais que de l'indirubine.

C'est BEYERINCK (110) qui le premier, en 1900, eut l'idée d'utiliser la réaction des indogénides, formulée par BAEYER, pour la recherche de l'indoxyle dans les végétaux, et c'est BOUMA (111) qui l'appliqua en 1901 à la recherche de l'indoxyle dans les urines.

Le procédé à l'isatine chlorhydrique, comme nous l'appellerons dorénavant, ne met en jeu aucun oxydant, ce qui est un premier avantage sur les divers procédés de la méthode précédente, car il n'y a aucune perte de matière colorante par suroxydation de celle-ci; de plus, et c'est sur ce point que nous appellerons fortement l'attention, le procédé est d'une exquise sensibilité. L'indoxyle des chromogènes urinaires donne, en se copulant avec l'isatine, une quantité d'indirubine qui est exactement le double de celle que donnerait la méthode aux oxydants, en admettant pour un instant que celle-ci ne produise pas de suroxydation.

Voici comment on opère :

L'urine est déféquée au moyen des sels de plomb, et l'excès de plomb chassé par le sulfate de sodium; le filtrat est additionné de son volume d'acide chlorhydrique tenant en dissolution une

(110) BEYERINCK. *Versl. kon. Akademie Wetensch. Amsterdam*, p. 579, 31 mars 1900.

(111) BOUMA. Ueber die Bestimmung des Harnindikans als Indigorothe mittelst Isatin-Salzsäure. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **32**, 82, 1901.

quantité variable d'isatine, dont le titre varie de 0 gr. 1 à 0 gr. 5 par litre, suivant la richesse des urines sur lesquelles on a l'habitude d'opérer; un excès d'isatine ne nuit d'ailleurs pas. On chauffe au bain-marie ou à feu nu pendant quelques minutes.

Les urines indiguriques, ou même celles qui sont très riches en indican, prennent déjà une coloration rouge à froid, quand on y ajoute de l'isatine chlorhydrique. Lorsqu'on chauffe, on voit apparaître, aux points les plus chauffés, des stries rougeâtres, qui augmentent d'intensité, et peu à peu la masse se colore uniformément en rouge vineux.

Par refroidissement, l'urine se trouble davantage, des flocons rouges d'indirubine se déposent. Lorsque le refroidissement est complet, on extrait l'indirubine avec le chloroforme ou l'éther; en répétant les épuisements, on peut obtenir toute la matière colorante.

Le procédé à l'isatine chlorhydrique (*procédé de BORMA*) peut s'appliquer à tout liquide physiologique, et c'est grâce à lui que nous avons trouvé de l'indican dans le sang (112). Quand on a affaire à des liquides albumineux, il est évidemment indiqué de se débarrasser au préalable de l'albumine.

La conjugaison de l'indoxyle et de l'isatine en milieu chlorhydrique donne théoriquement naissance à de l'indirubine; cependant, pratiquement, on peut dire qu'il se forme presque toujours un peu d'indigotine. Ceci est particulièrement net lorsque les urines sont *riches* en chromogènes indoxyliques.

C'est que dans ces conditions, le premier effet de l'addition de la solution chlorhydrique d'isatine dans l'urine est de donner un peu de bleu; on doit admettre que le premier indoxyle mis en liberté par l'acide chlorhydrique du réactif, avant de se conjuguer à l'isatine, est oxydé par la petite quantité d'oxygène qui se trouve en solution dans la liqueur et s'unit à une portion équivalente, également oxydée, pour fournir du bleu d'indigo. Il est évident, dans ce dernier cas, que l'*indigotine* formée est due tout entière à l'indoxyle urinaire, alors que l'*indirubine* ultérieure ne correspond

(112) HERVIEUX. Recherche de l'indoxyle dans le sang. *C. R. Soc. Biol.*, 56, 622, 1904.

que pour la moitié de son poids à l'indoxyle restant des chromogènes urinaires.

Dans de telles conditions, le dosage de l'indoxyle urinaire est entaché d'une erreur originelle et l'impossibilité de faire le départ exact de l'indoxyle qui, tout au début de la réaction, s'est uni à à lui-même après oxydation, pour donner de l'indigotine, et de celui qui s'est copulé avec l'isatine pour fabriquer de l'indirubine, enlève presque toute rigueur au dosage. On commettrait somme toute une erreur en divisant par deux la quantité de matières indigotiques obtenues pour avoir celle qui correspond à l'indoxyle urinaire.

Le bleu d'indigo, que nous obtenons par le procédé de BOUMA, avec les urines très indoxyliques, se retrouve à la fin de la réaction, même lorsqu'on laisse un quart d'heure, vingt minutes, au bain-marie bouillant. S'il s'agissait de l'hémiindigotine dont MAILLARD indique la formation en milieu acide et la transformation subséquente en indirubine, dans le même milieu à chaud, on ne devrait obtenir, à la fin de la réaction, que du rouge d'indigo.

Dans le but d'éviter cette formation d'indigotine, toujours évidente, nous le répétons, avec les urines riches en chromogènes indoxyliques, nous diluons considérablement les urines en question par 20, 30, 40, 50 fois leur volume d'eau; de plus, nous n'additionnons les liqueurs obtenues que du quart de la solution d'isatine chlorhydrique et à froid; ensuite, nous chauffons progressivement. Nous n'obtenons ainsi que de l'indirubine et, dans ces conditions, l'extrait chloroformique ou éthéré de la couleur, après plusieurs lavages à l'eau, à la soude diluée puis de nouveau à l'eau, est d'une très grande pureté; il serait très propre, à notre avis, à des détermination colorimétriques ou spectro-colorimétriques.

En résumé, il semble bien, d'après ce que nous venons de dire, que la réaction de BOUMA soit caractéristique de l'indoxyle; sa très grande sensibilité permet de déceler celui-ci, alors même qu'il se trouve à l'état de traces qui échapperaient, nous pouvons l'affirmer, à toute autre méthode de recherche, notamment celle qui emploie les divers oxydants dont nous avons antérieurement parlé.

Cependant si, dans les conditions normales des recherches uro-

logiques, la technique que nous venons de rappeler conserve toute sa valeur, il n'en est plus ainsi dans les conditions expérimentales.

M. PORCHER a, en effet, montré (13) qu'il est possible d'obtenir de l'indirubine en partant de chromogènes urinaires qui n'ont rien de directement indoxylique.

En administrant de l'éthylindol, du méthylindol, du diméthylindol, aux animaux, chien, chèvre, etc., on sait, ainsi que M. PORCHER et moi l'avons montré, que les urines ne renferment pas de chromogènes indoxyliques.

Additionnées à froid de leur volume d'acide chlorhydrique fumant, elles deviennent rapidement roses, puis rouges. La couleur se rassemble avec le temps, au fond, en flocons très déliés, laissant au-dessus d'eux une liqueur un peu décolorée. Le développement de la couleur rouge est activé par la chaleur; les oxydants semblent la favoriser, mais ils ne sont cependant pas nécessaires, ainsi que le prouve la formation du rouge dans le vide ou un gaz inerte. Les flocons ne sont solubles ni dans le chloroforme, ni dans l'éther; ce ne peut donc être de l'indirubine. Ils passent très facilement dans l'alcool amylique.

On peut néanmoins obtenir de l'indirubine en partant des chromogènes urinaires qui font suite à l'administration des homologues de l'indol dont nous venons de parler.

M. PORCHER additionne les urines à froid de leur 1/10 d'une solution chlorhydrique d'isatine à 2 pour 1,000, puis il chauffe lentement, jusqu'à l'ébullition maintenue une ou deux minutes; il obtient alors de l'indirubine et *uniquement* de l'indirubine, qu'on extrait, après refroidissement, par l'éther. La solution étherée est ensuite lavée à l'eau et à la soude diluée, pour la débarrasser de l'excès d'isatine qu'elle a pu dissoudre. Il ne faut pas prendre un égal volume d'une solution chlorhydrique d'isatine, ni faire porter son action sur l'urine préalablement chauffée, car, avant que l'isatine ait eu le temps d'agir sur le radical encore inconnu qu'une faible quantité d'acide chlorhydrique met peu à peu en liberté, il y aurait formation rapide, par une trop grande

(1 3) PORCHER. Obtention de l'indirubine en partant des chromogènes éthyl-, méthyl-, et diméthylindoliques. *Bull. Soc. Chim.*, 5-20 septembre 1907.

addition d'acide, de la couleur rouge dont il a été question tout à l'heure, laquelle n'est plus de l'indirubine.

Lorsqu'on administre du scatol aux animaux, il est possible, en opérant dans les conditions ci-dessus, d'obtenir de l'indirubine, mais ce n'est jamais qu'en très petite quantité, car le chromogène d'origine scatolique, ainsi qu'il a paru à M. PORCHER (communication orale), se décompose beaucoup plus facilement que les chromogènes d'origine méthylkétolique, diméthylindolique ou éthylindolique, par addition d'HCl, si ménagée que soit cette dernière. Les flocons de rouge scatolique apparaissent en effet beaucoup plus rapidement que ceux de rouge méthylkétolique, diméthylindolique, etc..., et, comme ceux-ci, ne sont plus susceptibles de se transformer en indirubine.

Comme les animaux ne fabriquent dans leur intestin ni méthylkétol, ni éthyl ou diméthylindol, la réaction de BORMA, effectuée en prenant les précautions que nous avons indiquées plus haut: addition à froid à l'urine du 4/5 de son volume d'isatine chlorhydrique, puis chauffage graduelle jusqu'à l'ébullition maintenue quelques minutes, ne peut fournir que de l'indirubine dérivée des chromogènes indoxyliques: la part du chromogène scatolique est nulle ou négligeable.

Lorsque la réaction de BORMA est terminée, les liqueurs sont agitées avec du chloroforme ou de l'éther, qui s'empare non seulement de l'indirubine formée, mais aussi de phénols, de matières colorantes indéterminées et aussi d'un peu d'isatine.

Ces substances, étrangères à la couleur recherchée, suffisent parfois à la masquer, surtout quand l'urine est pauvre en chromogènes indoxyliques; aussi les extraits chloroformiques ou étherés, bien que colorés en jaune, peuvent-ils très bien contenir de l'indirubine en solution.

Pour faire apparaître celle-ci, les extraits ci-dessus sont soumis à des lavages répétés et alternés, à l'eau puis à la soude à 1 p. 1000; les phénols, l'isatine, donnent des combinaisons sodiques qui passent dans la portion aqueuse, et le chloroforme ou l'éther prennent alors une belle coloration rose plus ou moins vive suivant la quantité d'indirubine dissoute.

Il est bien recommandé de n'utiliser que de la soude très diluée pour le lavage des extraits chloroformiques ou étherés obtenus à

la suite de la réaction de BOUMA, car si l'indirubine (comme l'indigotine) résiste à la soude diluée, elle peut être attaquée et détruite, s'il y en a seulement des traces, par la soude concentrée.

Les eaux alcalines des lavages sont colorées en jaune clair. Si on les acidule fortement par l'acide chlorhydrique, ce qui provoque un trouble léger, et si on les épuise plusieurs fois par le chloroforme, celui-ci s'empare à nouveau des substances organiques autres que l'indigo rouge. Le chloroforme évaporé donne un résidu que l'on reprend par l'eau et qu'on distille en présence de SO^4H_2 dans un courant de vapeur d'eau. Le distillat obtenu est incolore, possède une réaction acide et une forte odeur phénolique; il donne la réaction de MILLON et fournit un précipité abondant avec l'eau de brome comme cela a lieu avec les phénols.

On retrouve d'ailleurs ces phénols dans tous les extraits chloroformiques, qu'ils soient obtenus après l'emploi de la méthode aux oxydants ou de celle à l'isatine chlorhydrique, et que l'une ou l'autre de ces deux méthodes s'adresse à l'urine telle ou à l'urine déféquée par les sels de plomb (acétate neutre ou acétate basique).

Dans le cas où l'urine est déféquée par l'acétate basique, nous pensons, contrairement à MAILLARD, que l'extrait chloroformique ne peut pas renfermer d'oxyacides aromatiques, ceux-ci devant être entièrement précipités par l'acétate basique de plomb; leur mode de préparation repose d'ailleurs sur l'emploi de cette précipitation.

Indogénide du furfurol : L'indoxyle peut également réagir sur les aldéhydes pour former d'autres indogénides.

Les conditions de formation de l'indogénide dérivée du furfurol avec les urines indoxyliques ont été bien mises en lumière par M. E. NICOLAS (114).

On mélange volumes égaux d'urine et d'acide chlorhydrique, on ajoute quelques gouttes de furfurol dilué et quelques centimètres cubes de sulfure de carbone. On renverse lentement plusieurs fois le tube à essai et on laisse reposer. Le sulfure de carbone se rassemble dans le fond en présentant un dichroïsme rouge vert intense.

(114) E. NICOLAS. La réaction du furfurol appliquée à la recherche de l'indican dans l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, **60**, 183, 1906.

M. NICOLAS fait observer qu'une urine normale, chauffée avec son volume d'acide chlorhydrique, donne la réaction sans addition préalable de furfurol, parceque, dans ces conditions, les conjugués glycuroniques urinaires présents normalement fournissent du furfurol.

Lorsque les urines sont riches en dérivés indoxyliques, il faut au préalable les diluer. Sans cette précaution, l'addition d'acide chlorhydrique déterminerait la formation d'indigo qui, en se dissolvant dans le sulfure de carbone en même temps que l'indogénide du furfurol formé simultanément, pourrait nuire à la perception du dichroïsme caractéristique.

D'autres aldéhydes, grasses ou aromatiques (aldéhyde éthylique, aldéhyde benzoïque), peuvent également donner la réaction des indogénides.

COULEURS INDIGOTIQUES

LEUR CARACTÉRISATION

Dans ce chapitre, nous étudierons les propriétés des couleurs indigotiques retirées de l'urine, et nous verrons comment on les caractérise.

Nous rappellerons tout d'abord que la méthode qui consiste à oxyder l'indoxyle pour le transformer en indigo donne toujours un mélange de bleu (indigotine) et de rouge (indirubine).

En ce qui concerne plus particulièrement l'indirubine, il n'est pas possible d'en concevoir la formation d'après la théorie des indogénides, quand on emploie la méthode aux oxydants; seule la méthode à l'isatine chlorhydrique peut invoquer la théorie en question.

Comment, en effet, le pseudo-indoxyle de BAEYER pourrait-il rendre compte de la production d'indirubine dans l'urine? On peut imaginer toutes les façons possibles sous lesquelles réagit ce corps, sans pouvoir en déduire la forme indirubine.

A ce sujet, nous rappellerons qu'ELLINGER (115) a cru pouvoir avancer sans apporter d'ailleurs de preuves convaincantes, qu'il se formait dans l'urine, sous l'influence des réactifs, de l'isatine qui par condensation avec l'indoxyle présent, donnerait de l'indirubine.

Pour que la théorie des deux indogénides répondît bien aux faits, nous dirons avec MAILLARD qu'« il faudrait qu'une certaine quantité d'isatine se produisît d'emblée lors de l'oxydation de l'indoxyle. On verrait alors cette chose bizarre: un corps éminemment sensible à l'oxygène, l'indoxyle, se partageant en deux moitiés,

(115) ELLINGER. Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **38**, 178, 1903.

dont l'une resterait inaltérée, tandis que l'autre serait non seulement oxydée, mais suroxydée d'emblée en isatine, et cela sans qu'il fût possible de saisir la moindre trace du stade intermédiaire de l'oxydation, représenté par l'indigotine et l'indirubine. Les deux moitiés, l'indoxyle reste intangible et l'isatine produite se combi-neraient alors entre elles ».

Nous nous heurtons donc, pour expliquer la formation de l'indirubine par cette théorie, à des hypothèses insoutenables.

Et comment expliquer, par la théorie des indogénides, ce fait plus curieux encore que dans une urine indigurique en voie de putréfaction, c'est-à-dire franchement alcaline et qui n'a subi l'influence d'aucun réactif oxydant acide, il se forme toujours du rouge à côté du bleu d'indigo et quelquefois en quantités très notables. Chez certaines espèces animales, notamment la chèvre, il y a même, dans certains cas, prédominance marquée du rouge sur le bleu.

C'est en raison de l'impossibilité qu'il y a de faire dériver l'indirubine de l'indoxyle par la théorie des indogénides que M. MAILLARD a été amené à imaginer son hypothèse séduisante de l'hémiindigotine, corps générateur, soit de l'indigotine, soit de l'indirubine. Nous exposerons tout d'abord les points qui ont servi à M. MAILLARD pour étayer sa conception des couleurs indigotiques de l'urine.

Pour M. MAILLARD, la substance bleue extraite par le chloroforme de l'urine acidifiée ne serait pas identique à l'indigotine cristallisée ou à l'indigotine urinaire ayant déjà passé par la forme solide; il l'appelle *hémiindigotine* et lui assigne la formule en C¹⁶, attribuée antérieurement par BAEYER à l'indigotine :



l'indigotine cristallisée aura une formule double en C³². L'hémiindigotine se distinguerait de l'indigotine cristallisée par deux caractères importants, savoir :

- 1° Sa *solubilité* plus grande dans le chloroforme ;
- 2° Sa faculté de *polymérisation*.

Discutons chacun de ces points.

I. — SOLUBILITÉ DE LA SUBSTANCE BLEUE DANS LE CHLOROFORME

Lorsqu'on additionne l'urine, déléguée à l'acétate basique de plomb et débarrassée ensuite de l'excès de plomb, de son volume de réactif d'OBERMAYER (acide chlorhydrique 1,000, chlorure ferrique : 2), et qu'on agite dans une boule à décantation avec du chloroforme, le mélange verdit et le chloroforme se colore en bleu intense, au point parfois d'être absolument opaque sous une épaisseur de 15 mm. Tous les auteurs avaient admis jusqu'à présent que la substance bleue dissoute était identique à l'indigotine cristallisée obtenue soit par synthèse, soit en partant des plantes indigifères.

D'autre part, si l'on essaie de dissoudre dans le chloroforme acide de l'indigotine cristallisée qu'on a eu soin de broyer très finement auparavant, le dissolvant ne se colore que très légèrement en bleu.

Voilà deux faits qui ne sont pas contestables et au nom desquels SCHUTZENBERGER (116) s'était déjà refusé à admettre l'identité entre la couleur bleue de l'urine et l'indigotine cristallisée. C'est leur interprétation qui va maintenant donner lieu à des divergences et des hésitations.

Dans le cas de l'urine, on pourrait croire que l'indigo bleu s'est dissous au fur et à mesure de sa formation jusqu'à sursaturation. Et de fait, M. MAILLARD, en amorçant de telles solutions sursaturées avec un cristal d'indigotine ordinaire, a souvent vu la teinte bleue chloroformique diminuer d'intensité en même temps qu'il se produisait de fins flocons d'indigotine se rassemblant à la surface. Il semblerait donc, d'après cela, qu'il s'agit là d'un simple phénomène physique de sursaturation que l'amorçage a fait cesser. Mais, pour M. MAILLARD, tel n'est pas le sens qu'il faut attribuer au phénomène, ce n'est pas une cristallisation qui se produit, mais bien une polymérisation. Il avance que l'indigotine, quelle que soit son origine, fournit, lorsqu'elle a passé par l'état solide, des solutions chloroformiques n'ayant qu'une tendance très faible à la sursaturation, car, faites à chaud, elles laissent déposer par refroidi-

(116) SCHÜTZENBERGER. *Traité de Chimie générale*, t. 8, 459, 1890.

dissement de l'indigotine, au bout d'un temps variant entre douze heures et deux ou trois semaines. Rien de semblable ne se passerait avec la substance bleue extraite des urines. Des centaines de solutions chloroformiques bleues, extraites des urines simplement décantées et filtrées ou lavées à l'eau distillée seule, n'ont jamais laissé déposer d'indigotine solide. Certaines d'entre elles ont cependant été conservées pendant plus d'un an et demi. La solution chloroformique bleu foncé extraite des urines par le procédé d'UBERMAYER *diffère des solutions sursaturées préparées avec l'indigotine solide.*

En regard de ces faits, voici ceux que nous observons journellement et constamment avec des urines normales de chien, de cheval, d'homme, ou des urines expérimentales, relativement riches en indoxyle conjugué. Traitées par le réactif d'UBERMAYER, elles donnent *instantanément*, lorsqu'on y ajoute le chloroforme, un abondant précipité de flocons bleu foncé, aux beaux reflets cuivrés d'indigotine. Ce sont bien là des particules solides de bleu d'indigo, car elles sont retenues par le filtre sous forme d'un enduit abondant. Faut-il incriminer ici la richesse indoxylique de certaines de nos urines ? C'est probable et nous croyons que l'apparition de flocons est due à ce que l'indigo bleu a été formé en telle quantité que la limite de saturation dans le CHCl_3 a été dépassée.

La solution chloroformique filtrée est très foncée, opaque parfois sous une faible épaisseur ; elle renfermerait l'hémiindigotine de MAILLARD.

Un seul lavage à l'eau distillée, lavage très superficiel, d'ailleurs, car nous n'agitions jamais que faiblement le décanteur à robinet, amène dans cette solution une précipitation rapide et abondante de *nouveaux flocons* formant voile, qui sont retenus à leur tour sur le filtre. Le deuxième filtrat chloroformique, très limpide, est lavé cette fois avec de la soude diluée, à 1/1.000 ; le chloroforme se recouvre de nouveaux flocons bleu d'indigotine, lesquels sont généralement beaucoup moins abondants que dans les deux précipitations antérieures.

L'hémiindigotine — sorte d'indigotine à l'état naissant, de préparation toute récente — serait donc plus soluble dans le chloroforme très acide que dans le chloroforme moins acide et plus encore dans celui-ci que dans le chloroforme neutre.

Cette interprétation nous semble rationnelle, car, avec les flocons de bleu d'indigo qui viennent d'être précipités trois fois successivement, on peut répéter l'expérience. Ces flocons se redissolvent aisément dans le chloroforme fortement acidulé à chaud, en donnant une liqueur bleue très foncée, laquelle en abandonne déjà une partie à un premier lavage à l'eau, une deuxième partie à un second lavage identique et une troisième partie à un troisième lavage alcalin.

II. — POLYMÉRISATION

Lorsqu'on abandonne à lui-même un extrait chloroformique bleu, filtré, bien limpide, on constate qu'au bout de quelques jours, la couleur vire de plus en plus au rouge, ce qu'elle doit à l'indirubine.

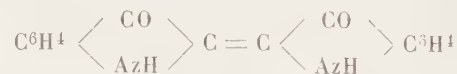
Pour MAILLARD, la couleur bleue, l'hémiindigotine en C^{16} se serait transformée en indirubine en C^{32} sous l'influence de la réaction acide du milieu. Mais, au contraire, si le même extrait est lavé sans plus attendre à l'eau distillée, puis à la soude diluée, la coloration du chloroforme reste la même; l'alcalinisation a fixé la couleur et l'a empêchée de virer au rouge. Mais, cette fois, c'est l'indigotine en C^{32} qui est en solution dans le chloroforme et non l'hémiindigotine en C^{16} .

MAILLARD traduit ces faits en disant :

« Le corps bleu de la solution chloroformique peut être transformé à volonté en indigotine ou en indirubine, selon que la réaction du milieu devient alcaline ou demeure acide. »

L'aspect des formules suivantes permet de fixer géométriquement la conception de MAILLARD.

Considérons l'indogénide α de BAEYER, l'indigotine en C^{16} , et cherchons de quelles façons peuvent se souder deux molécules de ce corps.

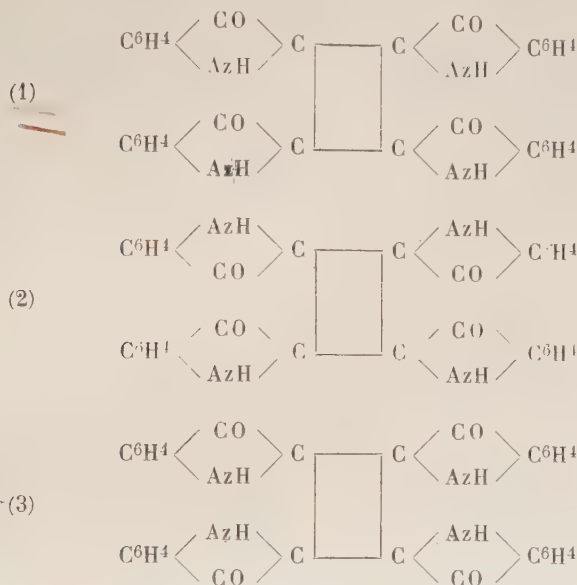


Trois combinaisons sont possibles :

1° Les noyaux pyrrol sont parallèles (1) :

2° Les noyaux pyrrol sont symétriques, les AzH étant à l'extérieur (2);

3° Les noyaux pyrrol sont symétriques, les AzH étant à l'intérieur (3).



La formule (3) est identique à la formule (2), car elle peut se superposer à elle par une simple rotation autour des sommets carbonés par lesquels s'effectue la soudure des deux molécules du C¹⁶.

Le groupement de deux molécules indogénide α peut donc former deux corps différents en C³²: l'un serait l'indigotine, l'autre l'indirubine.

M. MAILLARD a trouvé un gros appui à son hypothèse de l'hémi-indigotine en C¹⁶ et de l'indirubine et de l'indigotine en C³² dans les faits avancés antérieurement par M. VAUBEL (417, 418). VAUBEL fut amené, par une suite de considérations dans le détail desquelles

(417) VAUBEL. Ueber die Molekulargrosse des Indigoblaus und des Indigoroths. *Chemiker Zeitung*, 25, 725, 1901.

(418) VAUBEL. Zur Kenntnis des Indigoblaus und des Indigoroths. *Zeitschr. für Farben u. Textilchemie*, 1, 39, 1902.

nous ne voulons pas entrer, à rechercher quel était le poids moléculaire des indigos bleu et rouge.

Par la cryoscopie dans la paratoluidine et le phénol, il trouva, pour l'indigotine, une molécule en $C^{32}H^{20}Az^{10}O^4$; dans l'aniline, une formule en $C^{16}H^{10}Az^2O^2$. L'indirubine, cryoscopée dans la paratoluidine, avait également la formule en C^{32} .

Déjà en 1879, GIRAUD (119), en se basant sur des faits d'ordre chimique, tendait à admettre, pour l'indigo, une formule en C^{32} .

Certaines affirmations de VAUBEL viennent d'être contredites tout récemment par BECKMANN et GABEL (120).

Un autre fait observé également par WANG, BOUMA, ELLINGER, et sur lequel M. MAILLARD s'est basé pour étayer sa théorie de l'hémi-indigotine se transformant en rouge en milieu acide, est celui-ci : si l'on distille une solution chloroformique bleue extraite de l'urine, on la voit devenir violette, puis rouge violacé. A la fin de la distillation, du bleu d'indigo reste collé sur la paroi du ballon et l'on recueille une proportion d'indirubine plus forte qu'il n'en existait à côté du bleu dans la liqueur chloroformique primitive.

Il nous reste à exposer les faits que nous avons observés dans nos très nombreuses expériences. Certains d'entre eux, comme on le verra, ne cadrent nullement avec l'hypothèse de la polymérisation et de la transformation de l'hémiindigotine en indirubine.

Nous avons déjà vu, il est bon de le rappeler, que, suivant MAILLARD, la substance bleue n'est pas en solution chloroformique sursaturée et, lorsqu'on y jette un petit cristal d'indigotine, il se produit une polymérisation. La précipitation de celle-ci de ses solutions chloroformiques fortement acides ne serait donc pas due à un phénomène d'amorçage.

Comme il était cependant arrivé à MAILLARD de ne pas observer de virage au rouge dans des solutions chloroformiques très peu acides, parce qu'elles avaient été lavées à l'eau deux ou trois fois, il chercha la cause de cette inobservation à un fait qui lui paraissait très général, et la trouva dans ce que, sur les parois de sa

(119) GIRAUD. Sur quelques dérivés de l'indigotine. *C. R. Acad. Scienc.*, **89**, 104, 1879.

(120) BECKMANN et GABEL. Ueber Molekural Gewicht des Indigos. *Berichte*, **39**, 261, 1906.

verrerie, des parcelles d'indigotine s'étaient déposées et pour ainsi dire incrustées à la suite d'opérations précédentes analogues. « Je pense, dit-il, que la présence d'indigotine solide avait amorcé la transformation du corps bleu transitoire en indigotine et qu'il ne pouvait plus fournir d'indirubine. »

Nous pouvons affirmer, en ayant pris la précaution réclamée par MAILLARD (lavage préalable de la verrerie à l'acide sulfurique), que nous avons toujours vu se produire une précipitation d'indigotine en milieu fortement acide (urine, 1; HCl, 1), sans qu'il soit soit nécessaire de laver, soit à l'eau, soit à la soude.

Cette indigotine solide, qu'on recueille sur filtre, qu'on doit admettre comme polymérisée, est très soluble dans le chloroforme chaud acide; nous l'avons déjà indiqué plus haut.

Nous estimons, et c'est la conclusion que nous voulons apporter à toute cette discussion, qu'il est difficile, en l'état actuel de nos connaissances, de définir exactement les conditions qui donnent soit du bleu, soit du rouge d'indigo.

Les procédés industriels ou urologiques de préparation du bleu d'indigo donnent toujours un mélange de bleu et de rouge.

En partant d'une même urine, le procédé d'ÖBERMAYER donne du bleu d'une façon prédominante, mais il y a également du rouge, qu'on ne perçoit pas en raison du bleu qui le cache, mais que l'on peut très bien extraire avec l'éther. Par le procédé MAILLARD (oxydation par l'oxygène de l'air), on obtiendra souvent plus de rouge que de bleu.

Si, au lieu de prendre des urines, on s'adresse soit à de l'indoxyle préparé en partant de l'acide indoxylcarbonique ou à de l'indican pur, cristallisé, dissous dans de l'eau, on obtient également un mélange de bleu et de rouge par les divers procédés de la méthode aux oxydants, oxydation rapide ou oxydation lente. Dans tous ces cas, on a opéré cependant en milieu fortement acide; mais alors même que le milieu serait alcalin, la même observation pourrait être faite. C'est ainsi que l'indigurie expérimentale donne naissance à une prédominance de bleu d'indigo chez le chien, de rouge chez la chèvre, et, cependant, dans un cas comme dans l'autre, l'urine en pleine fermentation ammoniacale est alcaline; elle devient fluorescente dans la profondeur par suite du dédoublement du chromogène glycuronique de

l'indoxyle et mise en liberté de celui-ci, et ce n'est qu'à la surface que l'indoxyle oxydé au contact de l'air se transforme en indigo.

Nous avons maintes fois observé la formation de stries rouges d'indirubine le long du trajet que parcourent les premières gouttes de solution de soude tombant doucement dans une solution légère d'indoxyle dans l'eau distillée. Toutefois, lorsqu'on alcalinise franchement, c'est plutôt du bleu qui se fait, mais la formation de l'indirubine n'est pas niable.

En résumé, que la réaction du milieu soit acide ou alcaline, que l'on parte d'urines contenant des chromogènes indoxyliques ou de l'indoxyle lui-même, il y a toujours formation par les réactifs appropriés d'un mélange de bleu et de rouge, dont les proportions sont variables suivant le mode opératoire adopté.

Nous ne nierons pas les services qu'ont rendus les formules données par BAAYER pour l'indigo bleu et l'indigo rouge, mais elles ne nous permettent pas d'expliquer tous les faits que nous venons de relater et que nous avons si souvent observés, même en leur accolant l'interprétation si ingénieuse qu'en a donné M. MAILLARD.

Séparation du bleu et du rouge d'indigo et caractérisation de ces couleurs.

Nous venons de voir que, quels que soient les procédés employés dans l'industrie ou en urologie pour l'obtention des couleurs indigotiques, tous, sauf peut-être celui de BOUMA, donnent du bleu et du rouge. C'est un tel mélange que fournissent les divers procédés de la méthode aux oxydants appliqués à l'urine; c'est un tel mélange que l'on obtient avec les urines indiguriques en train de se décomposer.

La séparation des deux couleurs est facile et est basée sur la solubilité du rouge et l'insolubilité du bleu dans l'éther.

Quand on agite l'urine, au sein de laquelle on a déterminé la formation des couleurs indigotiques aux dépens de son indoxyle, avec du CHCl_3 , celui-ci dissout le bleu et le rouge. En évaporant

l'extrait chloroformique total, il reste un résidu dont le rouge sera repris par l'éther et le bleu par le CHCl_3 .

La purification complète de ces deux couleurs séparées se fait en épuisant à de nombreuses reprises les résidus d'évaporation de l'éther et du CHCl_3 et en lavant chaque fois l'extrait par la soude au millième et l'eau distillée.

Voyons maintenant comment nous avons caractérisé chacune de ces matières colorantes.

CARACTÉRISATION DE L'INDIGOTINE URINAIRE

La substance colorante bleue isolée des urines, et plus particulièrement de l'urine indigurique, est comparable en tous points à l'indigotine de synthèse pure.

Cette indigotine urinaire est une substance d'un bleu foncé, aux reflets cuivrés, mordorés. En la faisant cristalliser dans le phénol, suivant les indications de Méhu, nous avons pu l'obtenir à l'état de cristaux d'un bleu noir, qui se présentent sous le microscope avec un aspect prismatique.

Elle est insoluble dans l'eau, les acides et alcalis dilués. Elle est insoluble dans l'alcool et dans l'éther. Par contre, le chloroforme, le phénol, l'aniline sont ses dissolvants de choix. Elle est peu soluble dans l'alcool amylique, qui la laisse se déposer rapidement sur les parois du récipient. La solution chloroformique donne un spectre d'absorption caractérisé par la présence d'une bande dans l'orangé et le jaune, et identique à celui de l'indigotine synthétique.

Les réducteurs en milieu alcalin, ou la poudre de zinc en milieu acétique, décolorent l'indigotine urinaire : la couleur bleue réapparaît à l'air.

L'acide azotique concentré attaque l'indigotine retirée des urines pour donner transitoirement de l'isatine, puis de l'acide picrique qu'il est facile de caractériser par :

- 1° Sa couleur;
- 2° Son amertume;
- 3° La coloration rouge orangé avec les alcalis;
- 4° La formation d'une coloration rouge foncé d'acide purpurique avec le cyanure de potassium.

L'acide azotique dilué donne de l'isatine.

L'acide sulfurique dilué ne décompose l'indigotine ni à chaud, ni à froid; mais l'acide concentré la dissout pour donner une couleur bleu foncé. Il se forme d'abord un dérivé monosulfoné de couleur bleu verdâtre, puis le dérivé disulfoné, dont le sel de sodium est le carmin d'indigo. Ce dernier jouit d'un pouvoir colorant considérable. Il est décoloré déjà à froid par $\text{MnO}^{\text{I}}\text{K}$ en solution acide, pour donner de l'isatine, propriété qui est utilisée pour le dosage de l'indoxyle urinaire (méthode dite *de sulfonation*).

CARACTÉRISATION DE L'INDIRUBINE

L'indirubine, extraite par l'éther du mélange de bleu et de rouge d'indigo d'origine urinaire, se présente avec toutes les propriétés de l'indirubine de synthèse. C'est une substance friable, rouge foncé, qu'on obtient cristallisée par dépôt lent, à froid, de ses solutions faites à chaud dans le phénol, suivant le procédé de MÉHU : ce sont de petits prismes rouge brunâtre.

L'indirubine urinaire est insoluble dans l'eau, dans les alcalis dilués, dans les acides dilués, par contre, elle est très soluble dans l'éther, le chloroforme, l'alcool, l'acide acétique, l'alcool amylique. Toutes ces solutions sont rouge foncé, avec une tendance à l'orangé.

L'indirubine urinaire en solution étherée donne le spectre d'absorption de l'indirubine synthétique, bien purifiée avec tous les soins que M. MAILLARD reconnaît nécessaires.

Ce spectre coïncide également avec celui des solutions étherées d'indirubine que M. PORCHER a obtenu très simplement en partant des chromogènes urinaires méthylkétolique, éthylindolique, ainsi que nous l'avons vu précédemment.

La solution d'indirubine urinaire dans l'acide acétique est décolorée par la poudre de zinc, mais la coloration réapparaît après filtration et exposition ultérieure à l'air.

L'acide azotique concentré, réagissant sur l'indirubine, donne d'abord de l'isatine, puis de l'acide picrique, qui est le terme ultime de l'attaque :

L'acide azotique dilué donne après évaporation de l'isatine.

L'acide sulfurique dilué n'attaque pas l'indirubine; mais con-

centré, il la dissout en donnant d'abord un dérivé monosulfoné, puis un dérivé disulfoné de couleur rouge qui jouit d'un pouvoir colorant et tinctorial intense. Ce dérivé sulfoné est décoloré par le glucose et en général par tous les réducteurs.

Il est également décoloré par les oxydants, et notamment par le permanganate de potassium en solution acide, *mais à chaud seulement*, pour donner de l'isatine. Cette propriété est utilisée pour le dosage de l'indigo par les procédés de OBERMAYER, WANG, BOUMA.

Les solutions d'indirubine dans le chloroforme et surtout dans l'éther se décolorent rapidement, si on les expose à l'action de la lumière solaire.

Un caractère important de l'indirubine comme de l'indigotine, est de donner de belles vapeurs pourpres en se sublimant.

Dosage de l'indoxyle conjugué.

PURIFICATION DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE

Lorsque par l'emploi du réactif d'OBERMAYER ou de l'isatine chlorhydrique, on a fait passer l'indoxyle à l'état de couleurs indigotiques totalement solubles dans le chloroforme, il est obligatoire de purifier l'extrait chloroformique, c'est-à-dire le débarrasser de tout ce qui n'est pas substances indigotiques, surtout si l'on a en vue le dosage de l'indigo.

Cas de l'urine non déféquée : Si l'on se sert de la méthode aux oxydants, le chloroforme dissout outre les couleurs indigotiques, une série de composés organiques très différents les uns des autres, mais possédant tous des propriétés acides (phénols, crésols, acide bilirubinique, urobiline, oxyacides aromatiques, matières colorantes diverses). Ces substances rendent parfois difficile la perception de la teinte du dissolvant ; dans tous les cas, elles faussent le dosage soit par sulfonation, soit par pesée. Avec l'isatine chlorhydrique, on a les mêmes inconvénients, mais le chloroforme acide dissout, en outre des composés dont nous venons de parler, la presque totalité de l'isatine non utilisée dans la réaction. Nous avons déjà montré que s'il y a peu de dérivés indoxyliques dans

un liquide physiologique donné, urine ou autre, la majeure partie de l'isatine non entrée en réaction passant dans le chloroforme, ce dernier se colore en jaune; on pourrait alors croire que le chloroforme n'a pas dissout d'indirubine, ce qui serait une grave erreur. En effet, des lavages de l'extrait chloroformique à la soude diluée, puis à l'eau, en faisant passer l'isatine, les phénols, tous les corps acides qui les accompagnent dans l'eau font apparaître la teinte rose du chloroforme due à l'indirubine.

Cas de l'urine déféquée : Si l'urine a été déféquée, le chloroforme acide entraîne moins de substances étrangères, il est vrai, mais il dissout néanmoins des phénols et des matières colorantes jaune brunâtre que l'on éliminera comme il vient d'être dit.

En résumé, qu'il s'agisse d'une recherche qualitative ou d'un dosage de l'indoxyle urinaire, il est indispensable de procéder avec soin à la purification de l'extrait chloroformique contenant les couleurs indigotiques dérivées de cet indoxyle. Il est même recommandé de ne se servir que d'un chloroforme parfaitement purifié, ainsi que le demandent MM. MAILLARD et RANC (121, 122, 123). Ces auteurs ont justement insisté sur le retentissement que peuvent avoir les impuretés du chloroforme ordinaire sur les chiffres à obtenir; l'erreur peut quelquefois atteindre 100 pour 100.

Le chloroforme ordinaire des laboratoires est agité à plusieurs reprises avec 1/20 ou 1/30 de son volume d'acide sulfurique concentré, qu'on remplace tant qu'il se colore; le chloroforme est alors lavé trois fois avec le double de son volume de soude à 1 %, puis trois fois avec deux volumes d'eau. On décante, on passe sur filtre sec et on distille.

Les mêmes auteurs ont vu que le chlorure de carbonyle ne gênait pas pour les dosages.

(121) MAILLARD et RANC. Inconvénient des impuretés du chloroforme dans le dosage de l'indoxyle par la méthode de sulfonation. *C. R. Soc. Biol.*, **58**, 342, 1906.

(122) MAILLARD et RANC. Purification du chloroforme en vue des dosages d'indoxyle. *C. R. Soc. Biol.*, **58**, 483, 1906.

(123) MAILLARD et RANC. Limite de sensibilité du dosage de l'indoxyle par la méthode de sulfonation. *C. R. Soc. Biol.*, **58**, 518, 1906.

Évaluations approximatives de l'indigo urinaire.

Les anciens auteurs ne sachant pas même rechercher l'indoxyle urinaire avec sûreté, on ne saurait s'étonner de ne rencontrer chez eux que des essais timides de dosage. HELLER (124), SCHUNCK (125), CARTER (126), HOPPE SEYLER (127) se contentaient de faire agir sur l'urine les acides minéraux et de se baser sur la coloration plus ou moins intense que prenait le liquide. On conçoit tout ce qu'a de primitif un pareil procédé, car l'addition d'un acide minéral à l'urine donnait en même temps que les couleurs indigotiques des colorations brunes et rouges pouvant être absolument étrangères au groupe indigotique.

En 1878, WEBER (128), au lieu de traiter l'urine à froid par l'acide chlorhydrique, opère à chaud et extrait la couleur formée par l'éther. Dans ces conditions, la matière colorante obtenue est principalement constituée d'indirubine; mais toutefois, le bleu qui a pu se former n'ayant pas été dissous par l'éther, on néglige ainsi l'indoxyle qui lui correspond.

ROSENBACH (129, 130, 131) employait un procédé analogue, sauf qu'il remplaçait l'acide chlorhydrique par l'acide azotique.

Ce fut JAFFÉ (132) qui, le premier, tenta de réaliser un dosage sérieux de l'indoxyle urinaire en utilisant le procédé à l'hypochlo-

(124) HELLER. *Archiv. der Pharm.*, **98**, 203, 1847.

(125) SCHUNCK. Of the occurrence of indigo in urine. London, Edinb. and Dublin. *Philosophic Magaz.*, **14**, 288, 1867.

(126) CARTER. On indican in the blood and urine. *Edinburgh medic. Journ.*, **5**, 119, 859.

(127) HOPPE-SEYLER. Ueber Indikan als Konstantharnbestandtheil. *Archiv. für pathol. Anatom.*, **27**, 388, 1863.

(128) WEBER. Nachweis von Indikan im Harn. *Archiv. für Pharmac.*, **213**, 340, 1878.

(129) ROSENBACH. *Berlin. Klin. Wochenschr.*, nos 1, 13, 17, 22, 1889.

(130) ROSENBACH. Die diagnostische Bedeutung der Indigurie. *Wien. Mediz. Presse*, nos 21, 22, 23, 1893.

(131) EWALD. Die pathogenetische Bedeutung der Rosenbach'schen Reaktion. *Berlin. Klin. Wochenschr.*, n° 44, 1889.

(132) JAFFÉ. Ueber den Nachweis und die quantitative Bestimmung des Indikans im Harn. *Arch. für d. gesam. Physiol.*, **3**, 458, 1870.

rite qui lui servait à déceler l'indican dans l'urine. Nous avons longuement appelé l'attention sur les inconvénients que présentait ce procédé, qui fut le point de départ d'une série de techniques du même ordre, car toutes se ramènent au traitement de l'urine acide par un agent oxydant plus ou moins énergique.

Dans son procédé de détermination quantitative, JAFFÉ ajoute goutte à goutte à l'urine acide de l'hypochlorite de calcium; après chaque addition, il agite jusqu'à ce qu'il croit avoir obtenu le maximum de coloration bleue. Il laisse reposer pour obtenir la condensation de l'indigo formé en flocons qu'il recueille sur un filtre taré.

Beaucoup d'auteurs se sont servis jusqu'à présent de ce procédé : MASSON (90), GNEZDA, etc.

C'est alors que STOCKVIS, MÉHU (133) eurent l'idée de dissoudre la matière colorante bleu violacé ainsi formée dans le chloroforme; cela leur permettait, en outre, de réaliser une extraction plus complète de l'indigo.

Les couleurs chloroformiques obtenues, pouvant être très pures ou du moins paraissant telles, certains auteurs ont essayé de faire le dosage par les méthodes colorimétriques ou spectrocolorimétriques.

SALKOWSKI, SENATOR (134), VIERORDT (135, 136, 137), MÜLLER, KRÜSS (138) ont tenté une évaluation approximative de l'indigo urinaire en comparant la teinte du chloroforme urinaire avec celles de solutions chloroformiques d'indigotine pure, de titre connu. Il n'est pas douteux que la colorimétrie et mieux encore la spectrocolorimétrie donneraient des résultats appréciables si l'on avait affaire à des couleurs pures, qu'elles soient bleues ou rouges, mais comme dans tous ces extraits urinaires chloroform-

(133) MÉHU. Sur une urine à sédiment violet. *Journ. chim. et pharm.*, 14, 409, 1871.

(134) SALKOWSKI. Kleinere Mitteilungen physiologisch-chemischen Inhaltes. (III, Ueber die Bestimmung des Indigos im Harn.) *Arch. für pathol. Anatom.*, 68, 407, 1876.

(135, 136, 137) VIERORDT. Physiologische Spektralanalysen. *Zeitschr. für Biol.*, 10, 22, 1874; 10, 399, 1874; 11, 187, 1875.

(138) G.-H. KRÜSS. *Kolorimetrie und quantitative Spektralanalyse*, 1891.

miques il y a un mélange de rouge et de bleu d'indigo, qu'avec une même urine les proportions relatives de ces deux couleurs varient suivant les conditions dans lesquelles on a opéré, on s'explique qu'il n'est pas possible d'en obtenir de bons résultats.

Ajoutons à cela que l'emploi des hypochlorites amène toujours la formation d'une petite quantité d'isatine au détriment des matières indigotiques.

La méthode colorimétrique pourrait à peu près convenir, si au lieu des hypochlorites on utilisait le réactif d'OBERMAYER. Il n'y a guère à craindre de perte par suroxydation de l'indoxyle et si l'extraction chloroformique est faite avec diligence, on obtient presque uniquement du bleu.

Toutefois, dans ce cas, il est indiqué, avec les urines riches en indoxyle, de procéder à une dilution préalable, de façon que le chloroforme puisse dissoudre tout le bleu d'indigo formé. Faute de prendre cette précaution capitale, des flocons d'indigo se formeraient, que des extractions multipliées à froid ne pourraient dissoudre; il faudrait opérer à chaud, ce qui compliquerait les manipulations.

A notre avis, la colorimétrie conviendrait parfaitement avec le procédé de BORMA, qui ne donne naissance qu'à de l'indirubine très facile à purifier.

Dosages de l'indigo urinaire.

Le rigoureux dosage de l'indoxyle urinaire peut se faire de façons différentes s'appuyant, les premières sur la méthode aux oxydants, les secondes sur la méthode des indogénides.

PROCÉDÉS BASÉS SUR LA MÉTHODE AUX OXYDANTS

Procédé d'Obermayer, dit de sulfonation : En 1898, OBERMAYER (91) appliqua au dosage le procédé imaginé par lui plusieurs années auparavant, pour déceler l'indigo dans les urines.

Il précipite l'urine par l'acétate neutre de plomb. Après filtration, il introduit dans un décanteur 50 cc. du liquide et 50 cc. d'acide chlorhydrique renfermant du chlorure ferrique (acide

chlorhydrique : 1,000 cc. ; chlorure ferrique : 2 gr.) ; il agite vigoureusement avec du chloroforme, tant que celui-ci se charge de couleur bleue.

Les extraits chloroformiques sont réunis, concentrés, évaporés à sec et le résidu chauffé au bain-marie avec de l'alcool à 45 % qui enlève les matières colorantes rouges et brunes, qu'OBERMAYER regardait comme des impuretés. On verse alors sur le résidu quelques centimètres cubes d'acide sulfurique concentré, et on porte au bain-marie. Le dérivé sulfoné, d'un bleu intense, est versé dans l'eau pure et on le dose à chaud au moyen du permanganate de potassium titré.

Procédé Wang (139, 105) : La technique de cet auteur est très voisine de celle d'OBERMAYER ; il l'a donnée à peu près à la même époque que ce dernier.

Dans son premier article, WANG ne purifiait pas son chloroforme ; il distillait à sec et sulfonait directement le résidu, puis traitait le tout par le permanganate de potassium.

Ce n'est que plus tard, dans une deuxième communication (105), qu'il jugea nécessaire de se débarrasser des substances rouges et brunes qui se trouvaient dans le résidu provenant de l'évaporation du chloroforme, en employant un mélange à parties égales d'eau, d'éther et d'alcool.

La critique que l'on peut faire aux deux procédés ci-dessus réside sur le point de savoir si OBERMAYER et WANG ont raison de rejeter les matières colorantes rouges et brunes qu'ils ne veulent pas rattacher à l'indoxyle ; avec BOUMA, nous ne le pensons pas.

Modification de Bouma : Pour BOUMA (106, 140), en effet, les couleurs rouges et brunes éliminées par OBERMAYER et WANG dérivent directement de l'indoxyle ; on a affaire au brun et au rouge d'indigo et ces corps doivent être conservés, puis dosés.

WANG (104) ne fut pas de l'avis de BOUMA et continua à éliminer le rouge et le brun.

(139) WANG. Ueber die quantitative Bestimmung des Harnindikans. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 25, 406, 1898.

(140) BOUMA. Ueber die bei der Behandlung des Harnindikans mit Ferrichloridsäure aufstehenden rothbraunen Farbstoffe. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 30, 117, 1900.

Ce fut également BOUMA qui, pour éviter la formation de rouge et de brun d'indigo dans l'oxydation par la chlorure ferrique, introduisit le premier l'emploi de l'acétate basique de plomb dans la défécation des urines lorsqu'il s'agissait de rechercher l'indigo. BOUMA traitait l'urine par 1/10 de son volume d'extrait de Saturne; il se débarrassait de la sorte d'une grande quantité de corps gênants organiques ou minéraux et obtenait un liquide bien décoloré. Le filtrat est additionné de son volume d'acide chlorhydrique (selon OBERMAYER), puis agité avec du chloroforme. Ce dernier, décanté, filtré, est distillé à sec. Le résidu est lavé à l'eau bouillante, traité par l'acide sulfurique concentré, puis dosé au moyen du permanganate de potassium.

BOUMA (92), à la suite des reproches adressés à son procédé par ELLINGER (141) et MAILLARD (142), qui affirment avoir mis en évidence de l'isatine dans les produits de réaction, montre qu'après une heure il n'y a pas trace d'isatine produite, si on emploie le réactif d'OBERMAYER.

Somme toute, cette modification de BOUMA constitue un progrès notable; les matières indigotiques se forment très rapidement et l'extraction totale peut être faite en moins d'un quart d'heure.

Le reproche qu'on peut lui adresser, c'est qu'il est difficile de procéder au lavage à l'eau bouillante du résidu chloroformique avant la sulfonation: le lavage, en effet, entraîne toujours mécaniquement quelques parcelles adhérentes aux parois de la capsule.

Procédé de Maillard (143): Il ne diffère des précédents que par la façon dont est conduite l'oxydation. Au lieu d'employer le chlorure ferrique, MAILLARD laisse l'oxygène de l'air agir sur l'indoxyle. MAILLARD trouve que les divers agents oxydants donnent de l'isatine et, à ce titre, veut les remplacer par un oxydant faible ne pouvant conduire au terme isatine. Le procédé de MAILLARD est long et pénible.

(141) ELLINGER. Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **38**, 178, 1903.

(142) MAILLARD. Ueber die Entstehung der Indoxylfarbstoffe und die Bestimmung des Harnindoxyle (Entgegnung H.H. Bouma und Ellinger). *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **41**, 437, 1904.

(143) MAILLARD. Circonstances d'oxydation de l'indoxyle urinaire en couleurs indigotiques. *Bull. Soc. Chim.*, **29**, 533, 1903.

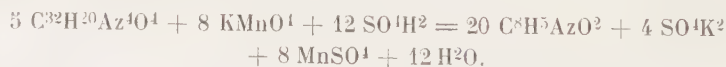
L'urine déféquée à l'acétate basique de plomb est additionnée de son volume d'HCl et bien agitée à l'air, avec du chloroforme; la majeure partie de l'indoxyle s'oxyde instantanément en hémindigotine qui passe dans le chloroforme. Lorsque le chloroforme ne se colore plus, on abandonne le mélange jusqu'au lendemain et on peut alors extraire les dernières traces de la couleur, sous forme d'indirubine. Si l'on est pressé, MAILLARD conseille d'ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée diluée et d'agiter chaque fois; dans ces conditions, la perte sous forme d'isatine doit être très minime, puisque MAILLARD n'a jamais pu déceler ce dernier composé.

Le chloroforme rassemblé est lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que les lavages ne soient plus acides, puis à la soude au millième trois ou quatre fois, enfin à l'eau distillée. Après chaque opération, le chloroforme doit être filtré.

Après distillation, on ajoute au résidu 10 cc. d'acide sulfurique concentré; la sulfonation est achevée après trois ou quatre heures à froid. On verse dans une capsule la solution du sulfoné avec 1 demi-litre d'eau, on rince plusieurs fois le ballon et on ajoute les eaux de lavage. On procède ensuite à l'oxydation du dérivé sulfoné par le permanganate de potassium. On verse la solution filtrée de permanganate de potassium très étendue dans la capsule à froid, le bleu disparaît déjà, mais la teinte rouge du dérivé sulfoné de l'indirubine persiste. C'est qu'en effet le permanganate de potassium n'oxyde pas, ou seulement très lentement à froid, l'indirubine sulfonée; il devient nécessaire de chauffer vers 80°. La disparition du rouge indique la fin du titrage.

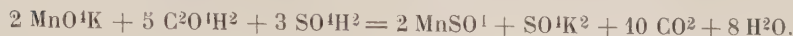
Suivant MOHR (144), pour obtenir une réaction complète en ce qui concerne le titrage des dérivés sulfonés de l'indigo, il faut que la dilution de l'indigo soit supérieure à 1 pour 10,000. Cette condition est toujours réalisée dans l'analyse des urines, si l'on verse le dérivé sulfoné indigotique dans un demi-litre d'eau.

L'oxydation de l'indigotine et de l'indirubine par le permanganate se ferait suivant la formule :



(144) MOHR. *Traité d'analyse par les liqueurs titrées*, p. 742, 1888.

et le titrage du permanganate de K par rapport à l'acide oxalique, se fait suivant la formule :



MAILLARD utilise la solution de permanganate qu'employait WANG dans ses dosages, soit environ 3 grammes par litre ; il en détermine le litre exact par l'acide oxalique. Au moment de l'emploi, on en prend 5 cc. dans 200 cc. d'eau et l'on fait tomber dans le sulfoné.

Le procédé d'extraction des couleurs indigotiques préconisé par MAILLARD nous paraît defectueux ; l'oxydation de l'indoxyle étant trop lente, on a généralement une prédominance de rouge, ce qui rend la fin de l'oxydation du sulfoné par MnO^4K moins facile à saisir.

PROCÉDÉS BASÉS SUR LA MÉTHODE DES INDOGÉNIDES

L'urine, déléguée à l'acétate basique de plomb et l'excès de plomb chassé par le sulfate sodique, est additionnée de son volume d'acide chlorhydrique tenant en dissolution 0 gr. 10 d'isatine par litre et on porte à l'ébullition pendant dix minutes.

Après refroidissement, l'indirubine est extraite par le chloroforme. Le dosage peut se faire alors de deux façons :

Dosage par sulfonation du résidu : On opère le dosage comme dans les conditions décrites plus haut ; le résultat doit être divisé par deux.

Dosage par pesée : Dans une capsule de platine tarée, on évaporerait une portion mesurée de l'extrait de chloroforme. On sèche le résidu à 100°. La différence de poids donne la quantité d'indirubine formée que l'on divise par deux.

Nous rappellerons qu'il est nécessaire de diluer fortement les urines riches en indoxyle conjugué, avant de les traiter par l'isatine chlorhydrique.

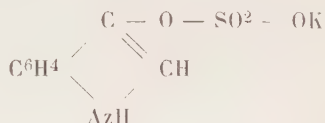
DES CHROMOGÈNES URINAIRES

DÉRIVÉS DE L'INDOXYLE

Dans les chapitres précédents, nous avons appris à caractériser et doser l'indoxyle urinaire sans nous préoccuper de la nature du radical acide qui lui était conjugué. Nous allons maintenant étudier les chromogènes qui en dérivent, c'est-à-dire l'indican et le chromogène indigurique.

Nous rappellerons que :

1° *L'indican urinaire* résulte de l'éthérification de l'indoxyle par l'acide sulfurique. Sa formule de constitution est aujourd'hui bien établie depuis les recherches de BAUMANN et BRIEGER (65); elle est la suivante :



2° *Le chromogène indigurique* résulte de la combinaison de l'indoxyle avec un acide organique appartenant au groupe des sucres, l'acide glycuronique de formule :



Rien ne nous empêche d'admettre l'existence dans les urines d'autres conjugués indoxyliques, et l'avenir nous réserve peut-être la découverte de chromogènes s'y rattachant et dont le radical acide serait différent de l'acide sulfurique et de l'acide glycuronique.

Indoxylsulfate de potassium (indican).

PRÉPARATION

A. — EXTRACTION DE L'URINE NORMALE D'APRÈS BAUMANN ET BRIEGER (65).

On prend des urines riches en indican que l'on évapore jusqu'à cristallisation; le précipité renferme des sels minéraux et de l'urée. Les eaux mères décantées ont une couleur brun foncé; elles sont épuisées à plusieurs reprises par de l'alcool à 90°. On obtient de la sorte environ 3 litres d'extrait alcoolique renfermant de grandes quantités d'urée, dont il faut se débarrasser.

A cet effet, on ajoute à froid une solution alcoolique d'acide oxalique tant qu'il se forme un précipité. On filtre rapidement et on verse dans le filtrat de la potasse alcoolique jusqu'à réaction faiblement alcaline. Le liquide est décanté et évaporé à 2 litres; puis on y ajoute un volume égal d'éther, ce qui détermine la formation d'un précipité. Ce dernier est sirupeux et renferme encore des sels minéraux, de l'urée, des substances extractives et des substances colorantes, ainsi que la plus grande partie des substances indigènes. Le sirop est ensuite repris par de l'alcool à 96° et reprécipité par un volume égal de nouvel éther. Ce dernier traitement peut être répété plusieurs fois.

Les solutions éthéro-alcooliques sont réunies et laissées au repos dans un endroit frais. Peu à peu se déposent, sur les parois du cristalliseur, des cristaux offrant l'aspect de tablettes transparentes, quadrangulaires, et qui à l'analyse se montrent comme constituées par de l'indoxylsulfate de potassium.

Différents auteurs se sont servis du procédé indiqué par BAUMANN et BRIEGER. HOPPE-SEYLER (77) l'a employé pour extraire l'indican de l'urine de lapins qui avaient ingéré de l'acide ortho-nitrophénylpropionique.

Nous avons employé plusieurs fois ce procédé sur des animaux qui avaient absorbé de l'indol, mais il a l'inconvénient d'être long et pénible et de comporter des pertes extrêmement considérables d'indican.

L'urée n'est pas totalement précipitée par l'acide oxalique et de

ce fait, lorsque les liqueurs finales se concentrent, l'urée s'accumule et gêne la cristallisation et la séparation de l'indican recherché.

Pour se débarrasser de l'urée on peut :

1^o Faire fermenter l'urine ou mieux les extraits provenant de l'urine avec le micrococcus uræ;

2^o Ou encore, ainsi que nous le verrons plus loin, entraîner l'indican par l'acétate plombique ammoniacal qui ne précipite pas l'urée.

B.— EXTRACTION DE L'INDICAN FAISANT SUITE A L'ADMINISTRATION D'ACIDE ORTHONITROPHÉNYLPROPIOLIQUE A DES LAPINS, SELON HOPPE-SEYLER (77, 145, 146).

HOPPE SEYLER a montré que des lapins, qui recevaient le sel de sodium de l'acide orthonitrophénylpropiolique, émettaient des urines très riches en indican. Il en extrayait ce composé de la façon suivante :

Les urines évaporées sont précipitées par l'alcool, puis filtrées; le filtrat est additionné d'un égal volume d'éther. Après vingt-quatre heures il s'est déposé dans le fond du vase une couche mince d'un sirop poisseux qui renferme quelques cristaux. La liqueur éthéro-alcoolique surnageant donne avec HCl et le chlorure ferrique une réaction plus intense que la masse poisseuse. Elle est précipitée par une solution alcoolique concentrée d'acide oxalique. On filtre rapidement et on ajoute du carbonate de potassium jusqu'à réaction alcaline. On évapore l'éther contenu dans le filtrat en ayant soin que la liqueur reste constamment alcaline. Le liquide résiduel est additionné de quelques gouttes de lessive de potasse, puis mis à évaporer au bain-marie. Il se dépose encore des sels qu'on sépare et on évapore le filtrat jusqu'à consistance épaisse. On additionne alors d'un litre d'alcool

(145) HOPPE-SEYLER. Beiträge zur Kenntniss der Indigobildenden Substanzen im Harn und des künstlichen Diabetes mellitus. (I, Mitteilung.) *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 7, 403, 1882.

(146) HOPPE-SEYLER. Zur Kenntniss der Indigobildenden Substanzen im Harn. (II, Mitteilung.) *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 8, 79, 1883.

absolu et on laisse déposer vingt-quatre heures dans un ballon; il se produit un précipité cristallin formé surtout de sels inorganiques. Il y a cependant dedans quelques cristaux d'indoxylsulfate, car, chauffés dans un tube, ils donnent des vapeurs caractéristiques d'indigo.

Le précipité total fut recueilli et mis à bouillir avec de l'alcool à 96°. Les jours suivants, il se séparait de la solution alcoolique une quantité ~~considérable~~ d'indoxylsulfate de K en belles tablettes que l'on peut obtenir à l'état pur par plusieurs cristallisations.

Comme nous le voyons, ce procédé de HOPPE-SEYLER ne diffère de celui de BAUMANN et BRIEGER que par la substitution dans le premier traitement de l'éther-alcool à l'alcool. Le mélange éther-alcool dissout en effet très bien l'indican.

C. — EXTRACTION A L'AIDE DE L'ACÉTATE PLOMBIQUE AMMONIACAL

Le procédé donné par BRIEGER (147), pour l'extraction des phénolsulfates de l'urine, peut s'appliquer à celle de l'indican urinaire. Dans ce but nous l'avons légèrement modifié, de la façon suivante :

L'urine fraîchement émise, acidulée par quelques gouttes d'acide acétique, est additionnée d'*acétate neutre plombique* tant qu'il se produit une précipitation; les sulfates, carbonates, phosphates, acide urique, matières colorantes sont entraînés, mais l'indican reste dissous. Le filtrat est additionné soigneusement d'*acétate basique de plomb* tant qu'il se forme un précipité; les chlorures, les pigments, les composés glycuroniques sont entraînés, mais cette fois encore l'indican reste en solution. Le filtrat peut alors être traité de deux façons différentes :

1° On fait passer un courant d'H²S pour le débarrasser du plomb, puis il est évaporé au bain-marie jusqu'à consistance de sirop épais, et placé ensuite dans un exsiccateur à vide; il se dépose des cristaux d'indican mélangés à de l'urée, dont on se débarrasse par fermentation avec le *micrococcus ureæ* (BRIEGER);

2° Le filtrat, qui doit contenir un excès d'acétate basique, est

(147) BRIEGER. Zur Darstellung der Aetherschwefelsäuren aus dem Urin. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **8**, 311, 1883.

traité par de l'ammoniaque aqueuse aussi longtemps qu'il se forme un précipité qui cette fois entraîne la majeure partie de l'indican.

Ce précipité, bien lavé, est mis en suspension dans de l'eau ou de l'alcool et est traité par un courant d'H²S. Nous recommandons d'ajouter un peu de carbonate d'ammoniaque, destiné à neutraliser les acides, qui, mis en liberté par H²S, pourraient décomposer partiellement l'indican. Ainsi, la liqueur reste sensiblement neutre pendant l'action d'H²S. On distille le filtrat sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse. On obtient un liquide coloré en jaune clair, qui ne renferme pas d'urée si l'on a pris soin de bien laver le précipité plombo-ammoniacal. Les sels minéraux éventuels sont précipités par l'alcool à 95°, l'indican reste dissous. Par évaporation lente, il se dépose, contre les parois du récipient, des cristaux d'indoxysulfate de potassium, que l'on purifie par cristallisation dans l'eau.

D. — PRÉPARATION DE L'INDOXYLSULFATE DE POTASSIUM SYNTHÉTIQUE,
D'APRÈS BAEYER

BAEYER (148) a appliqué la méthode donnée par BAUMANN (149) pour la synthèse des phénylsulfates. Il traite l'indoxyle dissous dans la potasse par le pyrosulfate de K et dit avoir obtenu un sel identique à celui que BAUMANN et BAEYER avaient extrait de l'urine des chiens auxquels ils avaient fait ingérer de l'indol.

L'indoxyle utilisé par BAEYER était obtenu par fusion de l'acide orthonitrophénylpropionique, suivant les indications de BAUMANN et TIEMANN.

BAEYER n'a pu isoler son indican de synthèse.

De notre côté, nous avons maintes fois essayé de préparer de l'indican synthétique, d'abord en suivant à la lettre les indications de BAEYER, puis en faisant varier les proportions et les conditions données par ce dernier, mais nous avons toujours échoué. L'in-

(148) BAEYER. Ueber die Verbindungen des Indigogruppes. 7. Indoxylschwefelsäure. *Berichte*, **14**, 1743, 1880.

(149) BAUMANN. Ueber die Aetherschwefelsäuren der Phenole. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **2**, 333, 1878.

doxyle était obtenu par décomposition de l'acide indoxylcarbo-
nique au moyen de l'eau bouillante, dans un courant de gaz
d'éclairage. L'eau était décantée; dans le liquide goudronneux
restant, qui constituait de l'indoxyle pur, on y jetait, tout en con-
tinuant à faire passer le courant de gaz d'éclairage, la solution de
potasse concentrée pure, puis, dans la solution d'indoxylate de K
ainsi obtenue, on ajoutait peu à peu le pyrosulfate de K finement
pulvérisé. On fermait à la lampe les deux tubes, celui d'arrivée et
celui de sortie du gaz d'éclairage et on portait à l'étuve plusieurs
jours (à 40°). Pour voir s'il s'était formé de l'indican, la masse
alcaline obtenue était dissoute dans l'eau, puis agitée pendant
longtemps à l'air qui transformait en matières indigotiques l'in-
doxyle qu'on estimait ne pas être entré en réaction. Finalement,
on neutralisait avec de l'acide acétique et on filtrait.

Dans le filtrat, on recherchait l'indican par les réactions que
nous connaissons. Les résultats ont toujours été négatifs.

Les réactions positives observées par BAEYER nous semblent
devoir être rattachées à l'indoxyle restant dans le produit de pré-
paration.

PROPRIÉTÉS DE L'INDICAN

Propriétés physiques. L'indican, extrait des urines par les diffé-
rents procédés que nous venons d'indiquer, constitue des tablettes
rectangulaires incolores, présentant au premier abord de grandes
analogies avec les cristaux des phénylsulfates alcalins. Ces tablettes
se dissolvent très facilement dans l'eau froide et dans l'eau chaude.
Par contre, elles sont très difficilement solubles dans l'alcool
froid, plus facilement dans l'alcool chaud. Toutefois, même avec
celui-ci, il faut avoir soin de broyer les cristaux pour en faciliter
la solution, qui est des plus lentes si on prend les tablettes cris-
tallines sans les pulvériser. Le meilleur dissolvant est l'alcool
méthylique.

L'indican est insoluble dans l'éther, l'éther acétique, le chlo-
roforme, le tétrachlorure de carbone, l'acétate d'amyle, l'alcool
amylique, la pyridine.

L'indican est inactif sur la lumière polarisée.

Propriétés chimiques. Les solutions d'indican sont stables vis-à-

vis des alcalis et elles se laissent facilement évaporer sans décomposition en présence des lessives alcalines faibles.

L'indoxylsulfate de K présentant, comme l'indol, un groupement imine $AzH =$, nous nous sommes demandé si ce corps ne donnerait pas, comme l'indol, un précipité avec le chlorure mercurique. Une solution d'indican traitée par une solution saturée de chlorure mercurique ne donne aucune trace de précipitation, même après quatre jours de contact.

L'indican reste inaltéré lors de la putréfaction de l'urine.

A l'analyse, l'indican se comporte comme étant le sel alcalin de l'éther sulfurique de l'indoxyle, appelé acide indoxylsulfurique.

Dans quelques-unes de leurs réactions, les indoxylsulfates alcalins se comportent comme les phénylsulfates; comme eux, ils se dédoublent facilement par hydrolyse, au moyen des acides chlorhydrique ou sulfurique dilués.

Les solutions d'indican ne sont précipitées, ni par l'acétate neutre, ni par l'acétate basique de plomb.

En solution neutre, l'indican se décompose déjà, vers 120° - 130° , en bisulfate de K et en un mélange d'indigotine et d'indirubine.

Les acides minéraux, surtout HCl, déjà à froid, mettent l'indoxyle en liberté; ce dernier se transforme à l'air libre en indigo, plus rapidement si on emploie des agents oxydants autres que l'oxygène atmosphérique. Si les solutions d'indican sont concentrées, il ne se forme pas immédiatement de couleurs indigotiques. L'indoxyle rendu libre est très stable vis-à-vis de l'acide chlorhydrique fort, et la solution, qui est jaune rougeâtre, avec un dichroïsme intense, peut rester ainsi douze et même vingt quatre heures sans qu'on puisse percevoir la plus petite formation, soit d'indigotine, soit d'indirubine. Nous avons fréquemment observé ce fait, avec des urines expérimentales, très riches en dérivés indoxyliques.

Les acides organiques dédoublent moins rapidement l'indican que les acides minéraux.

Une solution d'indican pur, additionnée d'acide phosphotungstique et de quelques gouttes d'acide sulfurique, ne donne aucun précipité. La liqueur se colore un peu après quelques jours; elle présente une teinte violette, due à l'indigo mis en liberté par SO_4H^2 ajouté.

Chauffés rapidement dans un tube à essai bien sec, les cristaux d'indican se décomposent en donnant des vapeurs rouge cramoisi très denses, d'indigotine qui se déposent sur les parois supérieures plus froides.

Analyse. — Substance sèche : 0 gr. 3073.

Indirubine formée après copulation avec l'isatine : par pesée, 0 gr. 3215 = 104,65 %.

Sulfate de baryum produit après hydrolyse chlorhydrique : 0 gr. 2870 = 93,39 %.

	Trouvé	Calculé
Indirubine	104,65 %	104,38 %
Sulfate de baryum	93,38 %	92,91 %

CHROMOGÈNE INDIGURIQUE

Après de nombreux tâtonnements sur la nature du chromogène indigurique, nous sommes parvenu à le caractériser d'une façon certaine comme étant le produit de la conjugaison de l'indoxyle avec l'acide glycuronique.

C'est à ce dernier acide que nous avons songé tout d'abord au début de nos recherches expérimentales sur les corps du groupe indolique en nous laissant uniquement guider par les hypothèses émises par certains auteurs, notamment SCHMIEDEBERG (150), KULZ (151), BAUMANN (152), etc.

Il est même bon, pensons-nous, de montrer ici que souvent les raisonnements, quelle qu'en soit l'apparence logique, peuvent nous écarter momentanément de la vérité.

« On a pensé, disions-nous il y a quelques années (68), et beaucoup d'auteurs pensent encore que le chromogène indigurique doit être un conjugué glycuronique de l'indoxyle. La preuve directe de cette assertion n'a jamais été faite et les arguments sur lesquels on s'est appuyé pour lui donner quelque valeur ont été tirés de la constatation d'une action réductrice sur la liqueur de Fehling et surtout de celle du pouvoir lévogyre des urines contenant ce chromogène.

« Bien que nous ayons déjà fait le procès de cette manière de voir, nous croyons utile de rappeler la critique que nous avons

(150) SCHMIEDEBERG. *Archiv. experim. Pathol. u. Pharm.*, **14**, 307, 1881.

(151) KÜLZ. Ueber einige gepaarter Glukuronsäuren. *Zeitschr. für Biol.*, **27**, 248, 1891.

(152) BAUMANN. Zur Kenntnis der aromatischen Substanzen im Thierkörper. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **1**, 67, 1877.

exposée dans un mémoire antérieur. Les assertions de ces auteurs (BAUMANN, HOPPE-SEYLER, KULZ, SCHMIEDEBERG...), disions-nous, nous semblent sans valeur, car ce qu'ils ont pris pour des conséquences ne sont que des coïncidences, et nous dirons même plus, des coïncidences obligatoires.

« On sait, en effet, que les urines sont normalement lévogyres, leur action rotatoire pouvant beaucoup varier du jour au lendemain. Il en résulte donc que les auteurs précités n'avaient pas le droit de s'appuyer sur la constatation d'un pouvoir lévogyre de l'urine, qui, nous ne saurions trop le répéter, est normal, pour conclure d'abord à une corrélation entre ce pouvoir lévogyre et l'administration d'indol, ensuite à l'existence d'un glyco-conjugué de l'indoxyle dérivant de ce dernier.

« D'autre part, il peut arriver que, sous des influences qui nous échappent, et en dehors de toute ingestion expérimentale d'indol, l'urine du chien ou de la chèvre devienne réductrice, légèrement, il est vrai, mais nettement.

« Des glycosuries faibles, mais transitoires, ne sont pas rares chez l'homme et les animaux, et il ne faudrait pas, parce que, pour une fois, elles coïncident avec une administration de 1, 2 ou 3 gr. d'indol, croire que l'indoxyle se soit éliminé sous forme d'un conjugué glycuronique.

« D'ailleurs, si l'on veut bien y réfléchir, on se rappellera qu'un dérivé glycuronique n'est pas forcément réducteur avant son dédoublement ; s'il l'est toujours après, puisqu'il y a mise en liberté d'acide glycuronique, il ne peut l'être avant que du fait du composé qui, en s'unissant à cet acide, aura conservé libre une fonction réductrice. Or, l'acide indoxylglycuronique des auteurs ne possède pas cette dernière. L'argument qui s'appuie sur le fait que l'urine réduit la liqueur cupro-potassique après l'administration d'indol pour justifier l'existence d'un dérivé indoxylique de l'acide glycuronique nous semble donc erroné.

« Quoi qu'il en soit, si, pour clore cette discussion, le plus simple serait d'isoler le chromogène indigurique, il est néanmoins facile d'obtenir des liqueurs très concentrées extrêmement riches en chromogène et avec lesquelles il devient possible de résoudre nettement la question de l'acide indoxylglycuronique.

« Nous avons fait prendre à un chien 9 gr. d'indol en 5 jours ;

les urines, au fur et à mesure de leur émission, sont stérilisées, puis concentrées au vide sous la pression de 15 millimètres. Le résidu sirupeux est traité par cinq ou six volumes d'alcool fort qui précipitent la plupart des sels minéraux. On filtre, l'alcool est chassé et l'on obtient ainsi 93 cc. d'un liquide brun renfermant une quantité de composés indoxyliques susceptibles de fournir 7 gr. d'indigo. Cette liqueur n'est nullement réductrice; si on la traite à chaud, soit par HCl, soit par l'acide oxalique, on obtient, après avoir neutralisé ou chassé l'excès d'acide, des liquides qui ne sont pas non plus réducteurs.

« Nous avons employé l'acide oxalique, parce que ce composé organique dédouble lentement à froid, mais rapidement à chaud, les chromogènes de nature indoxylrique. »

Nous avons tenu à rappeler cette longue citation pour montrer, nous le répétons, que si nous avions apparemment raison dans la forme, nous avions en réalité tort dans le fond.

Si l'administration de 9 gr. d'indol en 5 jours nous a donné des résultats qui venaient en quelque sorte corroborer le raisonnement précédent, nous allons en donner tout de suite la raison qui, du même coup, nous expliquera combien la caractérisation du chromogène indigurique est difficile.

Lorsqu'on administre d'une façon suivie de fortes doses journalières d'indol, on provoque certes de l'indigurie; mais si le phénomène des urines bleues ou rouges est frappant et d'une très grande netteté, il faut bien savoir qu'il ne correspond qu'à une très petite quantité en poids de chromogène indigurique: la plus grande partie de l'indoxyle est restée encore sous la forme d'éther sulfurique.

Rien de surprenant donc, que dans l'expérience qui vient d'être rappelée, on n'ait pu déceler de chromogène indigurique; il y en avait si peu, que les difficultés de la caractérisation étaient très grandes.

Avant de revenir à l'acide glycuronique comme radical acide du chromogène indigurique, nous avons recherché successivement du côté de l'acide cholalique, de la cystine, du glyocolle et de l'acide carbamique.

Nous obéissions à une idée directrice qui dérivait de ce fait, que nous avons déjà mis en lumière, que le foie est parfois très

vivement excité lorsqu'on administre de fortes doses d'indol.

Nous pensions, *a priori*, que la copulation de l'indoxyle devait alors se produire dans le foie, bien entendu, et aux dépens de corps mis en liberté ou fabriqués même par cet organe : l'acide cholalique, le glycocolle, l'acide carbamique.

Nous dirons même, ne serait-ce que pour mettre en garde ceux qui se reposent vraiment trop sur les pures réactions de coloration pour caractériser certains composés en chimie physiologique, que nous avons cru un moment qu'il s'agissait bien, en effet, de glycocolle.

Voici pourquoi : après hydrolyse de nos produits d'extraction, nous obtenions des réactions de coloration très nettes, notamment la réaction à l'hypochlorite, ainsi que la réduction de l'azotate mercurique. Mais, toutefois, la réaction fondamentale du glycocolle, qui repose sur la formation du glycollate de cuivre, fut toujours négative.

C'est après avoir échoué de différents côtés que nous sommes revenu à l'idée de l'acide glycuronique, et cette fois, en administrant de très fortes doses d'indol, nous avons pu le mettre en évidence dans le chromogène indigurique par les plus importantes de ses propriétés physiques et chimiques.

Essais d'extraction du chromogène indigurique.

Nous nous sommes efforcé d'isoler le chromogène indigurique à l'état pur et cristallisé, et si nos essais n'ont pas été entièrement couronnés de succès, nous sommes arrivé cependant à des résultats intéressants.

Nous avons tenté l'isolement du chromogène de plusieurs manières :

1^o Par la méthode de BAUMANN utilisée pour l'extraction des éthers sulfuriques, modifiée et basée sur la précipitation fractionnée par l'alcool et l'éther;

2^o En entraînant le conjugué dans un précipité plombique d'où on le libérait ultérieurement pour essayer ensuite la cristallisation directe.

Dans toutes nos recherches, nous avons mis en œuvre des urines

indiguriques expérimentales obtenues après administration d'indol, soit au chien, soit à la chèvre.

PREMIER ESSAI D'ISOLEMENT DU CHROMOGÈNE

Un chien très robuste a reçu 9 grammes d'indol en l'espace de plusieurs jours. Nous avons recueilli en tout 7 litres d'urine que l'on stérilisait à l'autoclave après chaque émission. Cette urine est concentrée au vide, sous la pression de 13 mill. de mercure jusqu'à 190 cc. Le sirop obtenu de couleur brune est additionné d'alcool à 95°, ce qui détermine la formation d'un volumineux précipité poisseux. Après décantation, le liquide alcoolique est concentré dans le vide jusqu'à 93 cc.

On précipite cet extrait par un mélange d'alcool et d'éther, ce qui fournit un deuxième précipité fortement coloré en brun, mais moins abondant que le premier. Après décantation, l'éther est distillé et le liquide alcoolique résiduel est refroidi à 0° dans de la glace, puis traité par une solution alcoolique d'acide oxalique qui précipite l'urée à l'état d'oxalate d'urée.

On filtre rapidement sur le vide et le filtrat est neutralisé toujours à 0° par la potasse alcoolique pour enlever l'excès d'acide oxalique non combiné à l'urée. Après une nouvelle filtration, on se débarrasse de l'excès de potasse par un courant de gaz carbonique sec.

Le liquide alcoolique que nous avons alors en notre possession, débarrassé de la majeure partie de son urée, a été concentré au vide à 30 cc., il s'est formé des flocons brun chocolat très légers qu'on sépare et le filtrat est laissé au repos dans un exsiccateur à acide sulfurique.

Après vingt-quatre heures de repos, il se dépose de belles tablettes rectangulaires d'indican. Après plusieurs cristallisations, il reste un liquide brun clair, oléagineux, renfermant encore un peu d'urée, duquel on ne peut pas faire cristalliser le chromogène indigurique.

DEUXIÈME ESSAI

Une chienne de 18 kilos en bonne santé, soumise au régime de la soupe au pain depuis plusieurs semaines, reçoit dans l'espace de quatorze jours 37 gr. 25 d'indol.

Les urines étaient recueillies dans des vases renfermant du toluène, afin d'empêcher l'altération bactérienne de l'urine. Elles sont concentrées sous pression réduite au fur et à mesure de leur émission, puis le sirop clair obtenu traité par plusieurs volumes d'alcool à 95°. Nous avons ainsi, d'un côté, 6 litres environ d'extrait alcoolique et de l'autre, un dépôt mi-partie poisseux, mi-partie cristallin.

Après décantation, le liquide alcoolique est filtré, puis distillé sous pression de 14 mill. de mercure, de façon à obtenir 500 cc. d'un liquide brun rougeâtre, ne renfermant plus d'alcool.

Celui-ci est placé dans un décanteur et agité à plusieurs reprises avec de l'éther ordinaire.

L'éther se colore en rouge, puis en rose et enfin reste incolore ; ceci est dû à une petite quantité d'indirubine libre, provenant du dédoublement partiel d'une partie du chromogène indigurique malgré les soins et la rapidité avec lesquels les opérations ont été conduites.

Après décantation, le liquide brun aqueux possède une saveur saline fraîche, car il renferme beaucoup d'urée. On le traite par 4 litres d'alcool à 95°. On perçoit peu à peu un trouble qui va s'accroissant et on laisse au repos pendant vingt-quatre heures.

Le précipité brun est mis à part et le liquide alcoolique est traité à 0° par un excès d'une solution alcoolique d'acide oxalique, renfermant 60 grammes d'acide par litre d'alcool à 95°.

A 0° l'acide oxalique ne décompose pour ainsi dire pas les chromogènes indoxylés. Un précipité abondant se forme immédiatement ; on filtre sans tarder au vide et le filtrat est additionné rapidement d'une solution alcoolique de potasse, jusqu'à réaction fortement alcaline ; l'oxalate de potassium qui est insoluble dans l'alcool précipite. On filtre et l'on recueille ce dernier précipité qui est coloré en brun ; le filtrat alcalin est peu coloré, on y fait passer pendant longtemps un courant de gaz carbonique sec ; il se précipite du bicarbonate de potassium contre les parois du ballon, entraînant encore des substances brunes, alors que la liqueur se décolore davantage.

Le liquide alcoolique ainsi obtenu renferme encore de grandes quantités d'urée, car avec l'hypobromite de sodium on obtient un abondant dégagement d'azote.

Après ces divers traitements, nous sommes en possession de 8 litres de liqueur. Nous concentrons dans le vide jusqu'à 1,700 cc. le titre de l'alcool qui était 87° tombe à 60°. Ces 1,700 cc. sont traités par deux volumes d'éther (3,400 cc.), il se sépare immédiatement un liquide brun (275 cc.) que l'on additionne de 1 lit. 825 d'alcool absolu : il se produit un abondant précipité de bicarbonate de potassium qui entraîne encore des chromogènes indoxyliques.

L'urée, qui existe encore en grande quantité, gêne la cristallisation des composés indoxyliques; nous avons répété plusieurs fois la précipitation par l'acide oxalique et, finalement, une fois les liqueurs débarrassées de leur urée, on obtient une cristallisation d'indoxylsulfate de potassium.

Après chaque passage du courant d'anhydride carbonique, il se forme un précipité de bicarbonate de potassium qui entraîne une partie indoxylque englobée dans un magma noirâtre. Cette masse brune est alors traitée par l'alcool méthylique; par ce traitement il se dépose dans le fond du vase des masses cristallines, que nous séparons et que nous caractérisons comme étant du bicarbonate de potassium. Après évaporation à l'air libre, on traite à nouveau par l'alcool méthylique froid, par petites portions; on se débarrasse facilement de tout le carbonate. Après évaporation de l'alcool méthylique, on obtient un résidu brun chocolat qui est riche en chromogène indigurique. En effet, si nous plaçons un peu de ce résidu dans une urine humaine normale, *non indigurique*, il se produit après plusieurs jours un épais voile d'indigo. Notre produit entraîné avec le bicarbonate de potassium renfermait donc du chromogène indigurique.

Dissous dans l'eau, ce produit ne réduit pas la liqueur de FEHLING; mais hydrolysé par de l'acide chlorhydrique à 5 % au bain-marie pendant trois quarts d'heure, on obtient une réduction très nette.

Le produit, entraîné lors de la formation de bicarbonate de potassium et qui contient du chromogène indigurique, renferme également de l'indican, ainsi que le prouve l'apparition d'acide sulfurique par l'hydrolyse chlorhydrique.

Mais il n'y a pas que dans le précipité de bicarbonate potassique que nous trouvons le chromogène indigurique; la majeure partie

de celui-ci est même entraînée dans le précipité brun poisseux d'oxalate de potassium, déterminé par l'addition de potasse au liquide alcoolique dans lequel on a auparavant précipité l'urée par un excès d'acide oxalique.

Contrairement à ce qui se passe pour l'indican, ce n'est pas dans les filtrats alcooliques que l'on trouve surtout le chromogène indigurique.

En effet, après les traitements successifs que l'on vient de faire subir ~~aux~~ urines indiguriques, le produit terminal ne contient qu'extrêmement peu de chromogène indigurique.

C'est ce qui nous avait engagé à le rechercher dans les précipités successifs obtenus au cours des opérations.

Pour apprécier la présence du chromogène indigurique dans l'un ou l'autre de ces précipités, nous en dissolvions une petite partie dans une urine normale, *non indigurique*, ou encore dans de l'eau distillée et nous laissions exposer à l'air. Il se formait plus ou moins rapidement, plus rapidement dans la solution urineuse que dans la solution aqueuse, une pellicule superficielle d'indigo dont l'intensité dépendait, toutes choses égales par ailleurs, de la plus ou moins grande richesse du produit employé en chromogène indigurique. Ce procédé, très empirique, il est vrai, mais de grande valeur, va mieux en été qu'en hiver.

Enfin, tout en l'utilisant comme moyen de contrôle, nous y avons ajouté la caractérisation de l'acide glycuronique lui-même par son pouvoir réducteur, la formation de furfurol par distillation en présence d'acide chlorhydrique fort et sa combinaison hydrazinique.

Par l'emploi de ces réactions de divers ordres, nous avons pu nous rendre compte que la majeure partie du chromogène indigurique était bien entraînée dans le précipité brun poisseux d'oxalate de potassium; le précipité de bicarbonate de potassium le renfermait également; le premier précipité d'oxalate d'urée en était indemne.

La méthode de séparation du chromogène indigurique, calquée sur celle qui est utilisée pour l'indican, précipitations successives par l'alcool et l'alcool-éther, ne nous ayant pas donné les résultats que nous en espérions, nous avons essayé de nous débarrasser des substances poisseuses qui gênent la cristallisation *présumable* du

chromogène indigurique, en entraînant ce dernier dans un précipité plombique, d'où on pouvait ensuite le libérer.

TROISIÈME ESSAI D'ISOLEMENT DU CHROMOGÈNE PAR L'EMPLOI DES SELS
DE PLOMB

Le caractère glycuronique du chromogène indigurique le rattachant de ce fait aux sucres, nous avons mis à profit la propriété qu'ont ceux-ci de précipiter par l'acétate basique de plomb pour isoler le chromogène indigurique.

Comme ce dernier déféquant n'entraîne pas l'indican (indoxylsulfate), nous avons donc là, au premier examen, un moyen facile de séparation de ces deux chromogènes indoxyliques.

Les urines indiguriques expérimentales, dès leur émission, sont traitées par un léger excès d'acétate *neutre* de plomb, qui précipite beaucoup de sels minéraux (phosphates, sulfates, carbonates, une partie des chlorures), l'acide urique, des matières colorantes. urochrome, mais ne précipite pas le chromogène indigurique, ni l'indican.

Après séparation du précipité, le filtrat est traité par l'acétate *basique* de plomb en excès, qui entraîne toute ou la majeure partie du chromogène indigurique (comme cela a lieu pour les sucres) et ne précipite ni l'indican, ni l'urée, ni la créatinine, d'après ce que nous savons. Le précipité blanc obtenu est bien lavé, jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus rien avec l'isatine chlorhydrique. On le sèche, on le broie, on le tamise finement, puis on le met en suspension dans l'eau, en présence d'un peu de carbonate de potassium, et on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré. Quand tout le plomb est précipité, on filtre à la trompe et on concentre au vide, jusqu'à consistance de sirop clair, en ayant toujours soin que la réaction soit neutre. On peut laver sans crainte avec l'éther, qui s'emparera des acides oxyaromatiques qui pourraient être libérés.

On reprend de nouveau par l'alcool méthylique à 98', ce qui précipite les sels sodiques qui se trouvent dans le résidu, puis on ajoute un grand volume d'éther.

Le chromogène indigurique est peu soluble dans le mélange éther-alcool, ce qui n'a pas lieu de surprendre, étant donnée sa

nature sucrée. On laisse au froid et au repos pendant longtemps. Rien ne cristallise.

Lorsqu'on fait passer le courant d'hydrogène sulfuré, certains acides sont mis en liberté qui, en agissant sur le chromogène, peuvent le dédoubler en partie. C'est pourquoi on voit, dans ces conditions, se former des couleurs indigotiques en même temps que le filtrat devient très réducteur.

Ce grave inconvénient a été rencontré par tous les auteurs qui, avant nous, se sont occupés des conjugués glycuroniques, quels qu'ils soient (ac. urochloralique, mentholglycuronique) MAYER et NEUBERG) (153).

Pour éviter cette action des acides, nous ajoutons au précipité dans lequel doit passer l'hydrogène sulfuré une petite quantité de carbonate de potassium. La réaction se maintient alors neutre pendant le passage du courant d'hydrogène sulfuré.

Nous préférons employer le carbonate de potassium plutôt que le carbonate de baryum, car les sels solubles de baryum qui se forment précipiteront par l'alcool avec un aspect colloïdal.

Malgré tous nos essais, nous n'avons malheureusement jamais pu saisir même l'amorce d'une cristallisation, quoique nous ayons cependant bien eu le chromogène indigurique; le liquide est riche en indoxyle, il ne donne pas d'acide sulfurique par l'hydrolyse chlorhydrique, et il fournit toutes les réactions de l'acide glycuronique après cette hydrolyse.

S'il n'est donc pas possible de faire cristalliser le chromogène glycuronique, la méthode de précipitation par les sels de plomb nous a cependant permis de l'obtenir en solution et tout à fait séparé de l'indican.

Une précaution sur laquelle nous nous permettons d'insister est celle qui consiste à bien laver le précipité plombique qui a entraîné le chromogène indigurique. Faute de la prendre, on laisse dans les mailles du volumineux précipité ainsi obtenu une assez grande quantité de liquide urinaire au sein duquel on a déterminé la formation du précipité. Rien d'étonnant que dans les manipulations

(153) MAYER et NEUBERG. Ueber den Nachweis gepaarter Glukuronsäure und ihr Vorkommen im normalen Harn. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 29, 256, 1900.

ultérieures on retrouve une partie des constituants de ce liquide.

Cela nous explique pourquoi HOPPE-SEYLER (77, 145, 146), après administration d'acide orthonitrophénylpropionique à des lapins, a rencontré du glucose à côté d'indoxyle. Le glucose — normalement présent dans toutes les urines d'animaux qui ont reçu l'acide orthonitrophénylpropionique, lequel détermine toujours un peu de glucosurie — avait été partiellement entraîné par l'acétate basique de plomb; quant à l'indoxyle trouvé, il pouvait provenir de l'urine restée dans les mailles du précipité plombique qui n'avait pas été lavé.

En outre, avant toute hydrolyse du produit final des manipulations effectuées sur les urines de ses lapins, HOPPE-SEYLER avait noté une rotation droite correspondant à 3 % de glucose. S'il s'était vraiment agi d'acide indoxylglycuronique, la liqueur, avant l'hydrolyse, n'eût pas été réductrice et aurait dévié à gauche le plan de la lumière polarisée.

Caractérisation de l'acide glycuronique.

La caractérisation de l'acide glycuronique dans les urines indiguriques est basée sur :

- 1° Le changement de signe de la rotation imprimée au plan de la lumière polarisée par l'hydrolyse du conjugué lévogyre glycuronique de l'indoxyle;
- 2° L'apparition du pouvoir réducteur du fait de cette hydrolyse;
- 3° Les réactions de coloration attribuables à la nature pentosique de l'acide glycuronique;
- 4° Les combinaisons de l'acide glycuronique avec les hydrazines.

1° DE L'ACTION LÉVOGYRE DES URINES INDIGURIQUES SUR LA LUMIÈRE POLARISÉE

L'urine des chiens soumis au régime du pain est presque inactive sur la lumière polarisée; la rotation qu'elle imprime à celle-ci est voisine de 0°, quand elle n'est pas nulle. Mais après l'administration d'une forte dose d'indol, lorsque l'urine n'est pas réduc-

trice, celle-ci détermine une notable déviation à gauche de la lumière polarisée.

Après traitement à l'autoclave à 125°, pendant vingt minutes, en présence de 1 % d'acide sulfurique, ces urines neutralisées puis déféquées donnent, même sans être concentrées, une rotation droite qui est quelquefois peu accentuée parce que l'acide glycuronique est faiblement dextrogyre : $\alpha_D = + 19^{\circ}4$ (THIERFELDER, KULZ).

Voici les chiffres que nous avons obtenus avec des urines indiguriques ~~faisant~~ suite à l'administration de 9 grammes d'indol à une chienne soumise à un régime exclusivement hydrocarboné. Ces urines ont été déféquées par l'acétate neutre de plomb (urine 30 cc., réactif 4 cc.) et examinées dans des tubes de 30 cm.

7 juin. —	Pouvoir rotatoire	=	0°
8 juin. —	id.	=	voisin de zéro
9 juin. —	id.	=	— 0°10'
10 juin. —	Administration de 3 gr. d'indol :		
1 ^{re} urine :	Pouvoir rotatoire	=	— 0°40'
2 ^e urine :	id.	=	— 0°32'
3 ^e urine :	id.	=	— 0°34'
11 juin. —	Administration de 3 gr. d'indol :		
1 ^{re} urine :	Pouvoir rotatoire	=	— 1°30'
2 ^e urine :	id.	=	— 2°00'
12 juin. —	Administration de 3 gr. d'indol :		
1 ^{re} urine :	Pouvoir rotatoire	=	— 0°30'
2 ^e urine :	id.	=	— 1°13'

2° POUVOIR RÉDUCTEUR DU CHROMOGÈNE INDIGURIQUE APRÈS HYDROLYSE

Les urines indiguriques fraîchement émises ne sont pas réductrices; mais, après l'hydrolyse sulfurique, elles le deviennent nettement, du fait de la mise en liberté de l'acide glycuronique qui est fortement réducteur.

S'il arrive quelquefois, avec des urines *non immédiatement examinées après leur émission*, de constater une faible réduction de la liqueur de FEHLING, cela tient à une décomposition amorcée du conjugué glycuronique.

Lorsque l'indigurie est nettement marquée, on conçoit *a priori* que, puisque d'un côté on trouve l'indigo correspondant à l'indoxyle du conjugué, de l'autre on doit rencontrer l'acide glycuronique antérieurement soudé à cet indoxyle avant le dédoublement de chromogène indigurique sous l'influence de la fermentation. Or, en réalité, la recherche de l'acide glycuronique ainsi rendu libre de son conjugué indoxylique n'est pas toujours facile dans une urine *altérée*, déjà bleue ou rouge; deux cas peuvent se présenter, l'altération de l'urine est récente ou ancienne.

1^o Si la fermentation n'est qu'à ses débuts, il suffira de neutraliser l'urine déjà ammoniacale avec un peu d'acide acétique, puis de la déféquer soigneusement avec l'azotate mercurique, pour retrouver l'acide glycuronique en solution dans le filtrat. L'azotate mercurique ne dédouble nullement le chromogène indigurique intact, quelle que soit la sévérité de la défécation. Dans ces conditions, si la liqueur terminale renferme de l'acide glycuronique, on devra en attribuer la présence à l'acide libre se trouvant dans l'urine traitée, du fait d'un dédoublement microbien de son chromogène indoxylique.

Lors de la défécation d'une pareille urine, le précipité produit par le réactif nitro-mercurique est fortement coloré en bleu-verdâtre par l'indigo déjà formé qui se trouve entraîné. Le liquide filtré est limpide et incolore; débarrassé de son excès de mercure par la poudre de zinc, il est réducteur, car il contient de l'acide glycuronique facile à caractériser d'autre part.

2^o Mais si l'altération microbienne de l'urine n'est pas de date tout à fait récente, l'acide glycuronique est devenu la proie des germes nombreux et variés de l'urine; il a été brûlé purement et simplement et il n'est plus possible d'en retrouver la trace. Des examens successifs d'une même urine indigurique depuis son émission jusqu'à sa putréfaction la plus avancée, nous ont permis de voir disparaître assez rapidement l'acide glycuronique avec les progrès de l'altération microbienne de l'urine. Dans ces conditions, l'indigo reste la seule trace de chromogène indigurique.

Nous employons la liqueur de FEHLING pour juger de l'action réductrice des urines déjà altérées ou hydrolysées par l'acide sulfurique et des liqueurs qui en proviennent après défécation.

Nous empruntons à M. PORCHER (154) le détail des soins qu'il faut prendre pour apprécier nettement le pouvoir réducteur, lequel passerait souvent inaperçu lorsqu'il n'est pas très développé.

« Il est toujours recommandé de filtrer l'urine.

« Dans deux tubes à essais, remplis au tiers environ, on fait bouillir d'un côté la liqueur de FEHLING préparée extemporanément par mélange des deux solutions cuprique et potassique (1) et, de l'autre, l'urine.

« A l'ébullition, on retire du feu et l'on verse avec précaution l'urine sur le réactif.

« Il se forme, bien entendu, une zone moyenne dans laquelle les deux liqueurs vont se trouver mélangées, zone plus ou moins étendue suivant la façon dont on a fait couler l'urine, petite si on a été doucement, grande si on a versé brusquement. Dans cette zone, les proportions de liqueur de FEHLING par rapport à l'urine vont en décroissant de bas en haut.

« Si l'urine est normale, le mélange conserve une limpidité parfaite, une transparence absolue qui ne se trouble nullement par le refroidissement. Tout au plus, observe-t-on, chez les herbivores surtout, quelques petits flocons d'un brun sale, rares et déliés qui finissent par se rassembler au fond. Mais j'insiste, la liqueur reste limpide et transparente en prenant de bas en haut du tube, par degrés insensibles, les teintes bleue, bleu vert, vert foncé, vert brun, brune et jaune brun; la première et la dernière sont celles de la liqueur de FEHLING et de l'urine sans aucun mélange; les intermédiaires correspondent au mélange en proportions variables de l'urine et du réactif cupro-potassique.

(1) Liqueur de FEHLING (formule d'ALLIEN) :

Liqueur bleue	{	Eau	500 cc.
		Sulfate de cuivre. . .	35 gr.
Liqueur blanche	{	Eau	500 cc.
		Potasse.	125 gr.
		Sel de seignette . . .	473 gr.

Au moment de l'emploi, prendre un volume de chaque liqueur et agiter le mélange.

(154) PORCHER. Des conditions pratiques de la recherche du sucre dans les urines. *Journ. de médec. vétér. et zootechn.*, 30 avril 1903.

« Si l'urine est sucrée, la zone moyenne dont nous avons parlé tout à l'heure va être le siège de réductions. (Voir la planche du mémoire original).

« Mais avant de dire dans quelles conditions se fera la réduction de la liqueur de FEHLING et d'expliquer les diverses teintes que celle-ci nous offrira, il est nécessaire de définir le rôle que joue la créatinine dans la production de ces teintes.

« La créatinine est un principe basique existant normalement dans les urines, aussi bien chez les carnivores que chez les herbivores. C'est une base forte qui, comme telle, peut jouer le rôle de l'ammoniaque; elle dissout, surtout à chaud, l'oxyde cuivreux formé et l'abandonne plus ou moins à froid. C'est cette dernière propriété qui va nous aider à comprendre certaines particularités que nous allons rencontrer dans l'examen de la réduction de la liqueur de FEHLING par les urines sucrées. De plus, ainsi que l'ont fait voir NEUMAYER (155) et CIPPOLINA (156), alors qu'une solution aqueuse de sucre réduit à chaud la liqueur de FEHLING en donnant un beau précipité rouge caractéristique d'oxydure, l'urine sucrée dans les mêmes conditions ne donne jamais qu'un précipité qui est jaune ou orangé, jamais rouge. Ce changement de teinte est imputable, ainsi que l'ont montré ces auteurs, à la créatinine et aux corps analogues qui se trouvent dans toute urine.

« Quand on a affaire à une urine très peu sucrée qui a été simplement filtrée et traitée suivant le *modus faciendi* décrit plus haut, on voit apparaître dans la portion moyenne du tube, par refroidissement, plus ou moins tardivement, une zone de réduction. Celle-ci est caractérisée par une *teinte uniformément verte si on l'examine par réflexion*, teinte s'étendant à la portion du liquide dans laquelle urine et réactif sont mélangés, s'arrêtant en bas, là où la liqueur de FEHLING est inaltérée, en haut, là où il n'y a que de l'urine. Cette teinte vire parfois vers le vert jaunâtre dans sa portion inférieure.

« Elle peut mettre une ou deux heures et même un peu plus à apparaître et ce retard est expliqué par deux faits: 1° le sucre

(155) NEUMAYER. *Deutsch. Arch. für Klin. Medic.*, 66, 193.

(156) CIPPOLINA. Ueber den Einfluss einiger Substanzen auf die Trommers'sche Probe. *Deutsch. Medic. Wochenschr.*, 27, n° 27. 440, 1901.

présent étant en faible quantité, la réduction du réactif n'est pas rapide; 2° l'oxyde cuivreux, résultat de cette réduction, est tenu en dissolution par la créatinine qui ne l'abandonne que par un refroidissement prolongé.

« *Je tiens à insister sur ce qu'a de significatif cette teinte verte. Toutes les fois qu'on l'obtient on ne se trompe pas en affirmant la présence du sucre.*

« En examinant le tube *par transparence*, cette teinte qui est verte par réflexion fait place à une teinte rouge orangé due à une sorte de piqueté tenant à la suspension dans la liqueur d'oxyde cuivreux très ténu; lentement, celui-ci va au fond du tube à essai et y forme un dépôt jaune orangé.

« Lorsque l'urine contient 3, 4, 5 grammes de sucre par litre, on constate qu'au contact de l'urine et du réactif, la réduction s'opère nettement en nous offrant par réflexion une teinte orangée ou rouge orangé caractéristique, limitée toujours en bas par une petite zone verte due à une réduction incomplète.

« Au fur et à mesure que nous avançons dans les couches supérieures, nous ferons les constatations suivantes: 1° au point de vue du temps; 2° au point de vue des couleurs.

« 1° *Au point de vue du temps*: La réduction se fait plus tardivement. C'est bien la teinte jaune ou rouge orangé à la limite du réactif et de l'urine qui apparaît toujours la première, les autres teintes ne se montrent que plus tard, lorsque le liquide commence à se refroidir et à un instant d'autant plus éloigné que nous envisageons des couches plus supérieures. C'est que, d'un côté, si dans ces portions supérieures, nous avons en présence plus d'urine et moins de réactif que dans les couches inférieures, ce qui devrait amener une réduction plus avancée de la liqueur de FEHLING, d'un autre côté, la proportion de créatinine est de plus en plus élevée et fait sentir son action en retardant l'apparition des teintes de réduction. Là où il y a peu de réactif, il y a relativement beaucoup d'urine et par conséquent suffisamment de créatinine pour tenir en dissolution à chaud l'oxydure cuivreux formé, lequel se dépose froid.

« 2° *Au point de vue des couleurs*: De bas en haut, à partir de la liqueur de FEHLING inaltérée, nous voyons apparaître les teintes rouge orangé, puis jaune orangé, jaunâtre, jaune verdâtre et vert

sale, se fondant graduellement les unes dans les autres. Là où la teinte est vive (rouge orangé ou jaune), il y a relativement beaucoup de liqueur de FEHLING, d'où une grande quantité d'oxydure produite, lequel se précipite rapidement car il n'y a pas suffisamment de créatinine pour le tenir en solution.

« Puisque la créatinine et les corps analogues sont si gênants dans la recherche du sucre urinaire et se trouvent être la cause des teintes jaune verdâtre, verte plus ou moins sale que, pour celui qui n'y est pas habitué, peuvent perdre de leur signification, y a-t-il un moyen de s'en débarrasser ? »

« Nous avons vu que seule la défécation avec le réactif nitro-mercurique peut nous donner à cet égard entière satisfaction. Par cette défécation, nous obtenons des liqueurs très limpides qui nous donnent une gamme de teintes de réduction nettes, franches, depuis le rouge vif, qui est plus ou moins violacé à la limite de la liqueur de FEHLING inaltérée, jusqu'au jaune orangé qui termine la série en haut. Nous n'obtenons plus de teintes jaune verdâtre et vert sale comme précédemment. »

Si, avec les urines indiguriques, la constatation du changement de l'action lévogyre en action dextrogyre par l'hydrolyse, si l'apparition en même temps du pouvoir réducteur qui faisait défaut antérieurement nous permettent d'affirmer rigoureusement l'existence d'un principe sucré, l'acide glycuronique, que nous allons mieux caractériser tout à l'heure, c'est grâce aux conditions expérimentales dans lesquelles nous nous sommes placé. Nous tenons à y revenir, car sur elles reposent en partie la solidité de nos conclusions.

En soumettant le chien au régime lacté ou au régime du pain, cet animal nous donne des urines d'action rotatoire nulle ou sensiblement nulle, d'action réductrice également nulle, avant ou après l'hydrolyse sulfurique. C'est donc que ces urines ne contiennent pas de conjugués glycuroniques. Il devient alors aisé d'interpréter rationnellement les résultats que nous fourniront, au cours du même régime, les administrations fortes et prolongées d'indol. Puisque l'acide glycuronique apparaît, c'est qu'il s'y trouve uni à l'indoxyle en excès, le soufre convenable destiné à l'éthérification sulfurique de ce dernier étant devenu insuffisant.

La netteté de ces faits s'amointrit dès l'instant où l'animal

d'expérience n'est pas ou ne peut pas être soumis au régime indiqué. En effet, le chien qui mange de la viande, le cheval, la chèvre, sur le régime desquels il est peu facile d'influer, ont des urines dont l'action lévogyre est due à la présence de conjugués glycuroniques de l'indoxyle peut-être, mais aussi de beaucoup d'autres principes (phénols et principes aromatiques divers). Ces urines, après hydrolyse sulfurique, réduisent, et à la distillation, on retrouve les phénols qui étaient soudés à l'acide glycuronique.

Si donc, à de pareils animaux, on administre une quantité d'indol suffisante pour obtenir de l'indigurie, le conjugué glycuronique expérimental de l'indoxyle viendra se superposer à ceux qui existaient antérieurement, et il ne sera pas toujours facile de tirer des conclusions formelles de ces mauvaises conditions expérimentales. C'est peut-être pour cette raison que BAUMANN (152) (1) a dit avoir obtenu dans l'urine des phénols à la suite de l'administration d'indol.

Chez des chiens soumis au régime de la soupe de pain, nous avons recherché, dans l'urine, les phénols au cours de l'indigurie, de la façon suivante :

Les urines très riches en chromogènes, car elles faisaient suite à l'ingestion de 3 grammes d'indol, sont étendues de leur volume d'eau, puis de 5 % d'acide sulfurique; on distille à feu ou dans un courant de vapeur d'eau. Le distillat est recueilli en plusieurs fractions, dans chacune desquelles on recherche les phénols. Les résultats ont toujours été négatifs; la réaction de MILLOX, si sensible, l'eau de brome, ne nous ont rien donné. »

3° RÉACTIONS DE COLORATION

Nous distinguerons ici :

A. — Les réactions dues à la molécule entière de l'acide glycuronique et attribuables, comme nous le verrons, à sa nature pentosique.

B. — Les réactions dues à ses divers produits de décomposition, furfurol notamment.

(1) « so dass es sogar scheinen konnte, dass das Indol im Thierkörper nicht bloss in Indikan, sondern auch in Phenol überging. »

A. — Les réactions de coloration de l'acide glycuronique sont celles des pentoses ; par conséquent, elles ne peuvent pas, à elles seules, servir à le caractériser. Toutefois, elles n'en ont pas moins une réelle valeur qu'elles empruntent pour une partie aux circonstances dans lesquelles elles sont obtenues.

Précautions à prendre pour l'obtention de ces réactions de coloration : Ces réactions s'effectuent toujours sur l'urine hydrolysée par l'acide sulfurique ; tantôt on opère avec l'urine simplement hydrolysée, filtrée et neutralisée par CO_3Ba , tantôt l'hydrolyse sulfurique est suivie d'une défécation à l'acétate neutre de plomb ou à l'acétate mercurique. Il ne faut jamais, ici, utiliser la défécation à l'azotate mercurique, car dans la liqueur terminale il y a de l'azotate de sodium, lequel, en présence de l'acide chlorhydrique qui entre dans la composition des réactifs que nous allons avoir à utiliser, fournit de l'acide azotique ; ce dernier acide, en réagissant à son tour sur l'acide chlorhydrique des réactifs, donne de l'eau régale qui détruit la couleur.

Lorsqu'on opère sur des urines indiguriques en voie d'altération, renfermant par conséquent, à côté d'indigo, de l'acide glycuronique qui n'a pas encore été la proie des microbes, il faut ici encore procéder préalablement à l'hydrolyse sulfurique ; sinon, les réactifs riches en HCl , en mettant en liberté de l'indoxyle, amèneraient la formation d'indigo rouge ou bleu, qui masquerait les colorations caractéristiques obtenues avec l'acide glycuronique.

1. *Réaction colorée de l'acide glycuronique avec l'orcine.*

(Réaction de BIAL)

Parmi les réactions colorées de l'acide glycuronique, la plus importante sans conteste est celle de l'orcine chlorhydrique, donnée d'abord par TOLLENS (157, 158), modifiée ensuite par BIAL (159, 160, 161).

(157) TOLLENS et WHEELER. Ueber die Xylose und Holzgummi. *Berichte*, **22**, 1046, 1889.

(158) TOLLENS. Ueber Holzzucker und Holzgummi. Spektral. und Farbenreactionen von Xylose und Arabinose. *Annal. des Chem.*, **260**, 304, 1890.

(159) BIAL et HUBER. Ueber den Befund von gepaarter glukuronsäure in den Faeces nach Mentholdarreichung. *Beitrag. chem. Physiolog.*, **2**, 532, 1903.

L'opération se fait sur une urine que l'on a, au préalable, débarrassée de son indoxyle, comme nous venons de le voir.

Dans un tube à essai, on verse, volumes égaux, du liquide urinaire et du réactif suivant :

Acide chlorhydrique.	500 cc.
Orcine pure	1 gr.
Chlorure ferrique officinal.	XXV gouttes.

et on ~~porte~~ à l'ébullition ; le liquide se colore peu à peu en vert bleu et, par refroidissement, laisse déposer une matière colorante foncée, soluble dans l'alcool amylique en vert foncé.

Examinée au spectroscope, la solution amylique donne un spectre caractérisé par une bande située dans le jaune orangé et identique à celle que l'on obtient en partant de l'arabinose et des pentoses en général.

Alors qu'avec les pentoses il suffit de chauffer très légèrement KRAFT (162), avec l'acide glycuronique il faut porter à l'ébullition.

D'après BLUMENTHAL et ROSIN, on trouverait parfois dans le vert une bande d'absorption qui proviendrait de l'orcine ajoutée en trop grande quantité.

Le glucose, le galactose, le lévulose, donneraient avec l'orcine des réactions colorées *jaune brun*, mais leurs spectres ne présentent rien de caractéristique.

Il est recommandé de ne pas conserver le réactif de BIAL dans des flacons bouchés au liège, car il peut, en effet, se faire du xylose aux dépens du liège et au bout d'un certain temps le réactif se colore en vert (157, 158, 163, 164).

(160) BIAL. Ueber den Befund von gepaarter Glukuronsäure in den normale Faeces. *Beitrag. z. chem. Physiol.*, **3**, 528, 1903.

(161) BIAL. Ueber den Befund von gepaarter glukuronsäuren in der Galle. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **45**, 238, 1905.

(162) KRAFT. Ein neuer typischer Pentosenfall. *Apoth. Zeitung*. 611, 1906.

(163) TOLLENS. Ueber Farbenreactionen auf Xylose und Arabinose d. h. auf Pentoglycosen mittelst des Phloroglucin-Salzsäure-Reagens. *Annal. der Chem.*, **254**, 329, 1889.

(164) TOLLENS. Ueber den Nachweiss der Pentosen mittelst des Phloroglucin-Salzsäure-absatz-Methode. *Berichte*, **29**, 1202, 1896.

2. Avec la phloroglucine chlorhydrique.

L'urine déféquée donne, avec la phloroglucine en solution chlorhydrique, la coloration rouge brun que l'on obtient avec l'acide glycuronique libre. Pour faire la réaction, nous employons les proportions suivantes :

Urine déféquée	5 cc.
Acide chlorhydrique.	5 cc.
Phloroglucine.	une petite pincée.

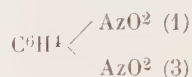
et on porte à l'ébullition. La coloration rouge brun passe en rouge foncé dans l'alcool amylique; elle diffère de celle obtenue en partant de l'arabinose, laquelle est d'un rouge violet harmonieux, et de celle du lévulose, qui se fait à froid.

La solution amylique, examinée au spectroscope, fournit une bande d'absorption très nette, dans jaune vert, mais non caractéristique de l'acide glycuronique, puisque les pentoses la donnent également (164').

3. Réaction de Bela de Bitto.

Nous avons fait comparativement la réaction sur de l'acide glycuronique pur extrait de l'acide euxanthique, et sur le même liquide provenant des urines indiguriques.

Voici comment il faut opérer : la liqueur glycuronique provenant de l'urine déféquée est additionnée d'une solution alcoolique de métadinitrobenzène :



On ajoute quelques gouttes de lessive de soude et on chauffe. On voit apparaître des stries rouges et la liqueur prend finalement une teinte uniforme violette.

Nous ferons remarquer que, dès l'instant où l'on opère en milieu alcalin, on peut se servir de l'urine déféquée par l'azotate mercurique après hydrolyse sulfurique.

(164') NEUBERG. Ueber die Farbenreactionen von Zuckern. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 31, 564, 1901.

4. Réaction de Molisch (165).

Les urines indiguriques donnent également la réaction de Molisch avec l' α naphтол.

On traite le liquide urinaire hydrolysé par quelques gouttes d' α naphтол en solution sulfurique; il se développe une coloration rouge violacé.

Pour bien percevoir la réaction, il faut opérer sur des liqueurs *très diluées*. On agite 1 cc. du liquide urinaire dilué avec deux gouttes d'une solution alcoolique (à 20 %) de α naphтол, puis on verse un volume égal d'acide sulfurique concentré; il se produit une coloration violette qui est précipitée en violet par l'eau. Ce précipité se dissout en jaune dans l'alcool ou l'éther. UDRANSKY (166, 167) a montré que cette coloration repose sur la formation de furfurol.

Les matières albuminoïdes donnent également cette réaction, d'où l'indication majeure de toujours se débarrasser de ces dernières si l'urine en renferme.

Cette coloration n'est nullement caractéristique de l'acide glycuronique, puisque la majeure partie des sucres la donnent. Ross (167') a étudié la sensibilité de la réaction à l' α naphтол sur les urines et a montré qu'elle était encore nette à 0 gr. 01 par litre.

B. — L'acide glycuronique, en raison de sa nature pentosique, donne facilement, comme les pentoses elles-mêmes, du furfurol par chauffage de ses solutions en présence de l'acide chlorhydrique fort.

Déjà bien avant de savoir s'il existait dans l'urine de l'acide glycuronique, des auteurs avaient remarqué qu'elle renfermait des substances fournissant du furfurol par distillation avec les acides

(165) MOLISCH. Zwei neue Zuckerreactionen. *Monatsh. für Chem.*, **7**, 198, 1886.

(166) UDRANSKY. Ueber Furfurolreactionen. (I, Mitteilung.) *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **12**, 358, 1888.

(167) UDRANSKY. Ueber Furfurolreactionen. (II, Mitteilung.) *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **12**, 383, 1888.

(167') ROSS. Ueber das Vorkommen von Kohlenhydraten im Harn von Tieren. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **15**, 519, 1891.

forts. C'est ainsi que DE CHALMOT, GUNTHER et TOLLENS (168) projetaient le résidu d'évaporation de 200 cc. d'urine normale dans l'acide chlorhydrique et distillaient; ils obtenaient environ 25 milligrammes de furfurol.

Pour obtenir le furfurol aux dépens de l'acide glycuronique ou des pentoses, il faut se placer dans des conditions toutes spéciales.

On distille au bain d'huile (169) la liqueur contenant de l'acide glycuronique avec 100 cc. d'acide chlorhydrique de densité 1,06, que l'on fait couler progressivement dans le ballon. Les liquides recueillis sont neutralisés par le carbonate de sodium et additionnés d'une petite quantité de chlorure de sodium; on pourrait en extraire le furfurol au moyen de l'éther.

Le réactif que nous avons utilisé de préférence pour caractériser le furfurol dans le distillat est l'aniline en solution acétique; on obtient une belle coloration rouge avec des traces de furfurol. Cette réaction jouit d'une grande sensibilité.

Il faut préparer cette solution d'acétate d'aniline avec soin, sinon, elle se colore d'elle-même en rouge. Nous nous sommes arrêté à la formule suivante :

Aniline.	5 cc.
Acide acétique	2 cc.
Eau	5 cc.
Alcool à 95°.	5 cc.

Le liquide provenant de la distillation de l'urine en présence d'acide chlorhydrique est additionné de quelques centimètres cubes de la solution d'acétate d'aniline; il se développe immédiatement une belle coloration rouge grenadine, très voisine de la teinte d'une solution alcoolique d'éosine.

SCHIFF (170) a recommandé l'emploi, au lieu et place d'aniline, de la métaxylidine, mais nous n'avons trouvé aucun avantage à cette substitution.

(168) DE CHALMOT, GUNTHER et TOLLENS. Ueber die Bildung von Furfurol aus Glukuronsäure und deren Derivaten so wie aus Eiweissstoffen. *Berichte*, **25**, 2569, 1891.

(169) WHEELER et TOLLENS. Untersuchungen über Holzgummi. *Annal. der Chem.*, **254**, 320, 1889.

(170) SCHIFF. Furfurolreactionen. *Berichte*, **20**, 540, 1888.

L'acétate d'aniline donne une coloration rouge d'autant plus fugace qu'on a affaire à des liqueurs moins riches en furfurol. On a essayé de lui substituer le salicylate d'aniline (*réaction de Jorissen*) qui donnerait des couleurs plus stables; nos propres essais n'ont signalé aucune différence entre l'acétate et le salicylate d'aniline.

Le reproche que l'on peut adresser à la réaction qui donne naissance au furfurol est de ne pas être caractéristique de l'acide glycuronique et des pentoses, car MYLIUS, STONE, TOLLENS ont montré que le saccharose, par distillation avec de l'acide sulfurique ou de l'acide chlorhydrique à 12 %, fournissait aussi du furfurol; mais il est bon d'ajouter que le rendement est ici excessivement faible. Selon DE CHALMOT, il ne se formerait que 2 ‰ de la quantité de saccharose présent.

Traité par la phloroglucine chlorhydrique, le distillat renfermant le furfurol donne une belle coloration vert foncé qui se produit lentement à froid et qui se résout en un précipité noir en tous points identique à la phloroglucide.

WELBEL et ZEISEL (171) ont étudié les produits qui prennent naissance dans cette réaction. Ils ont trouvé que le précipité renfermait toujours un peu de chlore; ils recommandent ne outre que toujours se servir de phloroglucine exempte de résorcine.

MOREL (172) dose le furfurol par ce procédé à la phloroglucide et après centrifugation il pèse le précipité formé.

La propriété que possède le furfurol de donner par l'acide chlorhydrique fort du furfurol nous donne l'explication de l'intéressante réaction signalée par M. E. NICOLAS (173) pour la recherche de l'indoxyle. Le furfurol étant une aldéhyde peut donner comme toute aldéhyde avec l'indoxyle une indogénide, qui se dissout dans le sulfure de carbone avec une fluorescence très intense.

(171) WELBEL et ZEISEL. Ueber die Condensation von Furfurol mit Phloroglucin und eine auf diese gegründeten Methode der quantitativen Bestimmung des Furfurols aus Pentosen und Pentosanen. *Monatsh. für Chem.*, 16, 283, 1895.

(172) MOREL et FRAISSE. Dosage des pentoses et de l'acide glycuronique dans les organes d'animaux. *Bullet. Soc. Chim.*, (4), 1, 639, 1907.

(173) E. NICOLAS. Sur la recherche des conjugués glycuroniques dans l'urine normale. *C. R. Soc. Biol.*, 61, 149, 1906.

C. — *Formation d'acide saccharique* : Le liquide urinaire traité par l'acide azotique ou le brome, suivant le procédé de THIERFELDER (174), donne un acide dont le sel d'argent a les propriétés du saccharate d'argent, obtenu en partant du glucose. Nous avons employé avec avantage la méthode de NEUBERG et NEIMANN (175), qui leur a servi à doser l'acide glycuronique : sur 100 parties d'acide glycuronique, ils en retrouvent 95 à l'état de sel d'argent.

(174) THIERFELDER. Ueber die Glukuronsäure. *Berichte*, **19**, 3148, 1886.

(175) NEUBERG et NEIMANN. Quantitative Bestimmung gepaarter Glukuronsäuren. (IX, Mitteilung über Glukuronsäure.) *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **44**, 127, 1903.

COMBINAISON DE L'ACIDE GLYCURONIQUE AVEC LES HYDRAZINES

La fonction *aldéhyde* de l'acide glycuronique doit s'unir comme, elle le fait dans les sucres réducteurs, avec les hydrazines.

Mais il est de toute nécessité que les conjugués glycuroniques soient préalablement dédoublés. En effet, dans ces composés et en particulier dans le chromogène indigurique, l'absence de pouvoir réducteur avant l'hydrolyse indique que la soudure de l'acide glycuronique avec l'indoxyle s'est faite par le CHO aldéhydique; lors de l'hydrolyse, celui-ci redevient libre et peut réagir alors sur les hydrazines.

Entre toutes les hydrazines utilisées, celle qui donne le composé le plus caractéristique est la parabromophénylhydrazine.

Nous devons cependant dire ce que nous pensons du composé formé avec la phénylhydrazine ordinaire et des difficultés de son obtention en urologie, car nombre d'auteurs se sont basés sur son existence pour affirmer la présence de l'acide glycuronique dans des liquides physiologiques.

D'après THIERFELDER (176), l'acide glycuronique donnerait avec l'acétate de phénylhydrazine une combinaison qui se formerait aux dépens de 25 % de l'acide glycuronique présent, le reste échappant à la réaction. Si les solutions sont assez diluées, comme c'est le cas des urines, 100 % échappent à la combinaison.

Cette combinaison phénylhydrazinique se forme très lentement, en donnant des aiguilles cristallines jaunes; après leur dissolution

(176) THIERFELDER. Untersuchungen über die Glukuronsäure (I Mitteilung). *Zeitschr. für physiol. Chem.*, II, 388, 1887.

dans l'alcool, on obtient un résidu amorphe de formule $C^{21}H^{24}Az^5O^5$, alors que la phénylosazone de l'acide glycuronique devrait être $C^{18}H^{20}Az^4O^5$. Cette combinaison ne serait obtenue qu'en employant un sel alcalin de l'acide. (THIERFELDER.)

Toujours d'après THIERFELDER, « le glycuron » ou anhydride glycuronique, donne avec l'acétate de phénylhydrazine des gouttelettes brunes et une masse noirâtre.

GEYER, HIRSCHL (177, 178) assurent que l'aspect des cristaux et leur solubilité sont les mêmes que ceux de la phénylglucosazone.

La combinaison glycuronique obtenue avec la phénylhydrazine n'est ni propre à une détermination chimique, puisqu'on n'a pas obtenu de composé défini, ni *a fortiori* à une caractérisation de l'acide glycuronique.

Le produit de THIERFELDER serait un mélange d'osazone ($C^{18}H^{20}Az^4O^5$) et d'un sel d'hydrazide de celle-ci ($C^{24}H^{28}Az^6O^5$) en quantités égales.

De l'avis de THIERFELDER et de MAYER (178'), il se forme, suivant les proportions présentes de phénylhydrazine, des cristaux d'aspect différents, de constitution encore inconnue et qui n'offrent pour la recherche chimique de l'acide glycuronique aucune valeur."

La forme microcristalline des cristaux est au surplus très variable, et l'on ne saurait se baser sur elle pour tenter une détermination.

Nous en avons assez dit pour montrer que la diagnose de l'acide glycuronique fondée sur le seul examen microscopique de la combinaison avec la phénylhydrazine ne repose sur rien de sérieux.

La combinaison phénylhydrazinique de l'acide glycuronique ne se fait dans les conditions les moins défavorables qu'avec des solutions glycuroniques concentrées, sinon on a des résultats déplorables. Mais si elle ne donne pas de bons résultats pour la caractérisation de ce composé, il n'en est plus de même lorsqu'on se sert de la parabromophénylhydrazine.

(177) GEYER. Ueber den Werth der Phenylhydrazin-Zuckerprobe. *Wien. Medic. Wochenschr.*, 50, 1685, 1889.

(178) HIRSCHL. Ueber den Werth der Phenylhydrazin-Zuckerprobe. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 14, 377, 1890.

(178') MAYER. Ueber die Phenylhydrazinverbindungen der Glukuronsäure. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 29, 59, 1900.

En effet, nous dirons tout de suite que la combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique se présente sous la forme d'aiguilles jaune citron, très bien cristallisées, faciles à purifier, qui se distinguent des combinaisons que donne la parabromophénylhydrazine avec les sucres ordinaires (glucose, pentoses) par sa *complète insolubilité dans l'alcool absolu bouillant*.

Nous verrons d'abord comment on obtient le composé en question ~~en~~ partant de l'acide glycuronique pur retiré du jaune indien, selon la technique de GRAEBE (179) (1).

C'est NEUBERG (180) qui le premier a caractérisé l'acide glycuronique au moyen de la parabromophénylhydrazine



« On ajoute à 250 cc. d'une solution aqueuse d'acide glycuronique pur renfermant environ 2 grammes (calculés en anhydride d'après la rotation polarimétrique), 5 grammes de chlorhydrate de parabromophénylhydrazine et 6 grammes d'acétate de sodium. On porte à l'ébullition; le liquide se trouble d'abord, mais redevient clair au bain-marie. Après cinq à dix minutes, il commence à précipiter des aiguilles jaune clair. On retire du bain-marie, et, par refroidissement, on obtient un abondant dépôt cristallin; on essore et le filtrat est chauffé à nouveau. On obtient, après plusieurs opérations, la presque totalité de l'acide glycuronique à l'état de combinaison. »

NEUBERG recommande l'emploi du chlorhydrate de parabromophénylhydrazine et de l'acétate de sodium et rejette celui de la base parabromophénylhydrazine en milieu acétique, comme ne donnant que des insuccès. Cet insuccès tient sans nul doute à ce qu'à l'époque où NEUBERG (1899) communiqua ses résultats, il lui était

(179) GRAEBE. Ueber die Euxanthongruppe. *Annal. des Chem.*, **254**, 278, 1889.

(180) NEUBERG. Ueber eine neue Verbindung der Glukuronsäure mit Parabromophenylhydrazin. *Berichte*, **32**, 2395, 1899.

(1) Il nous est particulièrement agréable de remercier à cette place la Maison Lefranc et C^{ie}, de Paris, qui, gracieusement, a bien voulu mettre à notre disposition tout l'acide euxanthique dont nous avons pu avoir besoin.

C. H.

impossible d'obtenir la base libre parabromophénylhydrazine à l'état de pureté parfaite ; aujourd'hui, il n'en est plus de même, et c'est pourquoi nous recommandons de se servir de la parabromophénylhydrazine en milieu acétique, plutôt que du chlorhydrate en présence d'acétate de soude.

Lorsqu'on s'adresse à des urines qui sont peu riches en dérivés glycuroniques, la caractérisation du radical acide de ces derniers est souvent très difficile ; d'après NEUBERG même, très compétent en la question (communication personnelle), il serait impossible d'arriver à un résultat probant.

Nous nous permettons cependant d'avancer que, même dans des liqueurs très diluées, il devient généralement possible d'obtenir la combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique en s'entourant des précautions dont nous allons parler.

Il faut avant tout que l'acide glycuronique soit débarrassé aussi soigneusement que possible de toute substance étrangère qui générerait la formation de la combinaison parabromophénylhydrazinique et entraverait sa cristallisation.

C'est ainsi que nous avons vu que des solutions, même concentrées d'acide glycuronique obtenues en partant du jaune indien, solutions qui sont toujours brun foncé, ne donnent rien ou presque rien avec l'hydrazine dont nous parlons ; il est obligatoire, bien qu'il ne s'agisse pas là d'un liquide d'origine urinaire, d'opérer sa défécation à fond avec l'azotate mercurique ; il faut d'ailleurs peu de ce réactif, puisqu'il n'y a ici ni urée, ni bases créatiniques à précipiter comme c'est le cas pour l'urine. Toutefois, les impuretés, matière colorante et autres, qui entourent l'acide glycuronique, sont entraînées dans le précipité ; la liqueur finale est limpide comme de l'eau et le liquide originel, qui réagissait mal ou pas du tout avec l'hydrazine, donne cette fois une abondante précipitation d'aiguilles de la combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique.

Voici maintenant comment nous opérons dans le cas de l'urine :

Nos liqueurs provenant, soit de la décomposition des précipités plombiques par H^2S , soit des urines elles-mêmes non déféquées, sont hydrolysées à l'autoclave à 130° , pendant vingt minutes, en présence de 1 % d'acide sulfurique. On neutralise par le carbonate de baryum, on filtre et on défèque par l'azotate mercurique, puis

on chasse l'excès de mercure par la poudre de zinc. Les liqueurs filtrées obtenues sont limpides comme de l'eau.

On ajoute de la parabromophénylhydrazine fraîchement préparée et de l'acide acétique cristallisable, à raison de 1 goutte par centimètre cube. On porte quelques secondes au bain-marie bouillant en agitant vigoureusement et on filtre. La filtration a pour but de séparer l'excès d'hydrazine non utilisée; on reporte le filtrat, d'un beau jaune clair, au bain marie. Rapidement quand les ~~liqueurs~~ sont concentrées, lentement dans les autres cas, on voit se former des flocons cristallisés, jaune serin, qui se rassemblent par refroidissement ou par centrifugation; le liquide limpide est remis de nouveau au bain-marie et on recommence trois fois la même opération.

On a finalement, dans le tube de la centrifugeuse, un culot jaune clair, qu'on lave immédiatement avec de l'alcool absolu froid, puis bouillant, tant que l'alcool se colore en jaune, afin d'enlever la parabromophénylhydrazine en excès et la bromoaniline qui a pu se former.

Il est bon de prendre les précautions suivantes pour l'obtention de la combinaison :

1° Il ne faut pas ajouter trop d'acide acétique, car l'excès de celui-ci entrave la cristallisation de la combinaison hydrazinique; au lieu d'aiguilles bien cristallisées, on aurait un produit goudronneux.

2° Les aiguilles rassemblées par centrifugation doivent être lavées à l'alcool absolu froid, puis chaud, sans tarder. Si on les laisse baigner dans les eaux mères au sein desquelles elles se sont formées, elles s'altèrent, se colorent en brun, et il devient impossible de les purifier tout à fait.

La combinaison cristallisée obtenue est complètement insoluble dans l'eau froide et l'eau bouillante, l'éther, le benzène, l'éther acétique, l'alcool amylique, le chloroforme, l'alcool absolu bouillant; très soluble dans la pyridine et le mélange alcool-pyridine. Placée dans un exsiccateur à SO^4H^2 , elle conserve sa couleur claire et son point de fusion est de 235° - 236° (bloc MAQUENNE par fusion rapide).

Sa solubilité dans l'alcool-pyridine (pyridine, 4 cc.; alcool

absolu, 6 cc.) est mise à profit pour l'examen polarimétrique : on observe une forte rotation lévogyre : $\alpha_D = -369^\circ$.

Il faut de toute nécessité avoir à sa disposition un produit tout à fait pur si on veut faire l'examen polarimétrique ; sinon, beaucoup de solutions sont d'un jaune rougeâtre et ne se prêtent pas à la détermination du pouvoir rotatoire.

RECHERCHE DE L'ACIDE GLYCURONIQUE DANS DES URINES PAUVRES EN CE COMPOSÉ

Quand on n'a que de petites quantités d'acide glycuronique dans un liquide, il devient impossible d'y obtenir la combinaison hydrazinique, celle-ci se formant bien, mais restant en solution grâce aux impuretés qui l'entourent.

De là, la double nécessité de concentrer cet acide dans le plus faible volume de liquide possible et de le débarrasser des substances étrangères qui gênent ses réactions. Deux procédés s'offrent :

1° On hydrolyse l'urine et la défèque ensuite à fond par l'azotate mercurique. La liqueur terminale est concentrée : on obtient alors un liquide visqueux qui convient mal à la réaction. Il est riche en azotate de sodium. Pour l'en débarrasser, on le concentre davantage, à consistance de sirop épais, et on ajoute un excès d'alcool fort.

Les sels précipitent ; l'acide glycuronique reste en solution alcoolique. On chasse l'alcool par distillation sous pression réduite, et finalement on obtient un résidu liquide aqueux contenant l'acide glycuronique.

2° Nous préférons déterminer dans l'urine un précipité par l'acétate basique de plomb. On décompose le précipité, bien lavé au préalable, par H^2S ; on filtre et l'on concentre à feu nu ou mieux dans le vide. Les précautions que nous venons de rappeler s'inspirent, comme étant du même ordre, de celles qu'a soigneusement signalées M. PORCHER (181) dans sa note sur la caractérisation de petites quantités de glucose dans l'urine.

(181) PORCHER. De la caractérisation de petites quantités de glucose dans l'urine. *VI^e Congrès de chimie appliquée*, Rome 1906.

RECHERCHE DE L'ACIDE GLYCURONIQUE EN PRÉSENCE DU GLUCOSE

La recherche de l'acide glycuronique au moyen de la parabromophénylhydrazine est quelquefois assez difficile lorsqu'il y a une glucosurie concomitante. L'observation que nous avons maintenant à présenter est de même nature que celle qu'ont successivement signalée, NEUBERG (182), puis M. PORCHER (183) dans ses recherches sur la lactosurie.

M. PORCHER a montré la difficulté qu'il y avait, à l'aide de la phénylhydrazine, à caractériser de petites quantités de glucose en présence de plus fortes quantités de lactose, car la lactosazone retient à chaud en dissolution la glucosazone qui s'est formée en même temps. Le caractère principal de la glucosazone : insolubilité dans l'eau bouillante, venant à manquer, on serait ainsi tenté de nier ainsi la présence du glucose.

Si l'on considère maintenant l'acide glycuronique, il semble que l'insolubilité complète de la combinaison parabromophénylhydrazinique de cet acide dans l'alcool absolu permettrait de la purifier facilement et de baser sur elle la diagnose de l'acide glycuronique dans un mélange de glucose et d'acide glycuronique. L'osazone du glucose étant soluble dans l'alcool, plus à chaud qu'à froid, la séparation est intéressante, car l'acide glycuronique conjugué se trouve souvent mélangé au glucose dans certaines urines diabétiques, voire même dans quelques urines indigériques éliminées au cours d'une légère glucosurie transitoire, d'origine alimentaire le plus souvent.

Rien ne paraît donc plus facile, théoriquement, que de différencier ces deux sucres. L'urine hydrolysée, déféquée à l'azotate mercurique, est additionnée d'une quantité suffisante de parabromophénylhydrazine et d'acide acétique. On porte au bain-marie bouillant pendant une heure et quart à une heure et demie. Le précipité total est lavé à l'alcool absolu froid et bouillant. L'osazone du glucose devant se dissoudre seule, il restera la combinaison parabromophénylhydrazinique pure.

(182) NEUBERG. Ueber Löslichkeitverhältnisse von Osazonen. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **29**, 274, 1900.

(183) PORCHER. *Sur la lactosurie*. (Collection Critzmann.)

Mais, *s'il y a peu d'acide glycuronique en présence d'une quantité assez notable de glucose*, il arrivera, comme nous avons pu le constater, que, lors du lavage par l'alcool bouillant, la solution de la parabromoglucosazone dans ce dernier entraînera la combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique; tout se dissoudra alors dans l'alcool.

EXAMEN DES FORMES MICROSCOPIQUES DES COMBINAISONS DE L'ACIDE
GLYCURONIQUE AVEC LA PHÉNYLHYDRAZINE ET LA PARABROMOPHÉ-
NYLHYDRAZINE.

Nous nous sommes servi de l'acide glycuronique du jaune indien. La solution mise en expérience donnait au polarimètre une déviation de 0°,20 dans un tube de 20.

A. — Avec la parabromophénylhydrazine et l'acide acétique, il se fait rapidement, en bain-marie, un précipité jaune clair abondant remplissant le tube entièrement.

Examiné au microscope, il est formé de houpettes très fragiles, se désagrégeant facilement si on appuie sur la lamelle en donnant des aiguilles très fines.

B. — Avec la phénylhydrazine et l'acide acétique, la précipitation au bain-marie se fait plus lentement. Au bout de vingt-cinq minutes, il y a un précipité abondant jaune brun.

Examiné au microscope, ce précipité ne rappelle en rien le précédent: il est formé de petits amas sphériques sans tendance à cristalliser.

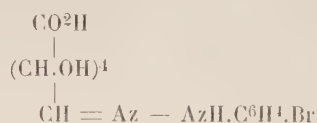
**Constitution de la combinaison parabromophénylhy-
drazinique de l'acide glycuronique.**

La combinaison que nous avons obtenue avec l'acide glycuronique de nos urines indiguriques et la parabromophénylhydrazine a été purifiée par de nombreux traitements à l'alcool absolu; elle s'est montrée en tous points identique à celle que NEUBERG a préparée en partant de l'acide glycuronique du jaune indien: aspect cristallin, insolubilité dans l'alcool absolu bouillant, solubilité dans le mélange alcool-pyridine, fort pouvoir lévogyre de

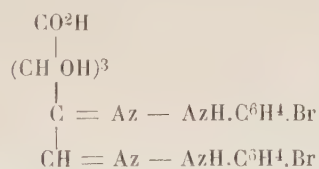
cette dernière solution. Son point de fusion, pris au bloc MAQUENNE par fusion rapide, est de 233°-236°.

Les auteurs ne sont pas d'accord sur la constitution de la combinaison de l'acide glycuronique avec la parabromophénylhydrazine. Ce qui est certain, c'est qu'une molécule d'acide ne réagit qu'avec une seule molécule d'hydrazine, ainsi que vont nous le montrer les dosages de brome.

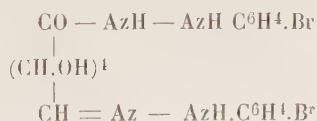
Mais il ne saurait s'agir de l'hydrazone de l'acide glycuronique de formule:



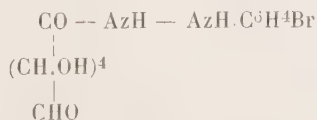
Par ses propriétés chimiques, la combinaison obtenue ne répond pas à celle d'une hydrazone; c'est ainsi que HCl à froid ne régénère ni l'acide, ni la parabromophénylhydrazine. On ne peut admettre également que nous avons affaire ici à une osazone, pas



plus qu'à une hydrazide-hydrazone, car ces deux formules récla-



meraient deux molécules de base pour une d'acide. L'hydrazide simple de l'acide glycuronique ne se conçoit pas non plus,



car, dans les conditions où l'on opère, le groupement CHO libre réagirait sûrement sur une deuxième molécule de base pour

donner l'hydrazide-hydrazone que nous venons de voir ne pas répondre à la réalité des faits.

Ce que *a priori* on doit admettre comme presque démontré, c'est la disparition du groupement CO^2H ; sinon, la fonction acide de l'acide glycuronique restant libre, on devrait pouvoir en obtenir des sels alcalins qui, très vraisemblablement, seraient solubles dans l'eau. La combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique n'est nullement soluble dans les lessives alcalines avec lesquelles elle ne contracte d'ailleurs aucune union.

Nous avons pensé, dès l'instant où la combinaison en question ne répondait qu'à l'union d'une molécule d'acide à une de base, et qu'il ne pouvait s'agir ni d'une hydrazide, ni d'une hydrazone, que nous avions peut-être affaire à un composé analogue aux lactazames.

Sous le nom de lactazames, on désigne des dérivés des hydrazones des acides-aldéhydes ou des acides-cétones dans lesquels il y a formation d'un anhydride interne par réaction de la fonction acide sur l'azote basique lié directement au noyau phénolique de l'hydrazine (BERTHELOT et JUNGFLAISCH).

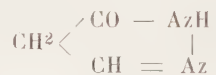
Le mécanisme qui donne naissance aux lactazames est identique à celui par lequel on obtient des lactames, mais comme l'azote de l'amide interne ainsi obtenu est lié d'autre part à un autre atome d'azote, on a donc affaire à des diazols que, dans le cas particulier, on désigne sous le nom de lactazames.

Il est facile de relier la combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique aux lactazames en question et même en remontant plus haut au pyrrazol.

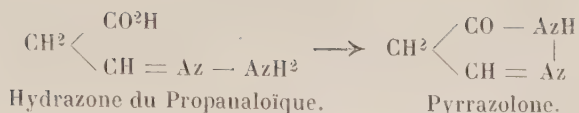
En effet, au pyrrazol :



correspond la pyrrazolone :



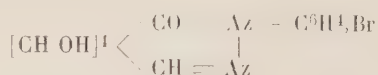
que l'on peut considérer comme la lactazame du propanaloïque, dérivée de l'hydrazine même ($\text{H}^2\text{Az} - \text{AzH}$).



La phénylpyrrazolone est la même lactazame dérivée cette fois de la phénylhydrazine.



Pour nous, le composé résultant de l'action de la parabromophénylhydrazine sur l'acide glycuronique serait une lactazame complexe de la formule :



Le premier effet de la parabromophénylhydrazine sur l'acide glycuronique serait de donner une hydrazone; la formation de l'amide interne serait consécutive.

La formule $\text{C}^{12}\text{H}^{13}\text{O}^5\text{AzBr}^2$ que nous venons de donner réclame 23,20 % de brome. Nous avons effectué plusieurs dosages, soit par la méthode à la chaux, soit par la méthode de Carius; nos chiffres ont toujours été très voisins du chiffre ci-dessus.

Voici un exemple d'analyse effectuée par la méthode à la chaux :

Poids de la substance.....	0,5440
Poids de bromure d'argent trouvé.....	0,3024
Brome trouvé.....	23,59 %
Brome calculé.....	23,20 "

MEDWEDEW (183') et nous-même avons essayé l'action de la paranitrophénylhydrazine sur l'acide glycuronique. La combinaison obtenue est rouge vif et jouit de propriétés très voisines de celle formée par la parabromophénylhydrazine.

(183') MEDWEDEW. Ueber ein Derivat der Glukonsäure und des p. nitrophenylhydrazins. *Berichte* **38**, 1646, 1905.

DE L'INDIGURIE

On dit qu'il y a indigurie lorsque l'urine, après son émission, prend une coloration bleue ou rouge, en se recouvrant d'une pellicule d'indigotine ou d'indirubine.

Nous avons vu que ce phénomène est dû à l'existence préalable, dans l'urine, d'un dérivé glycuronique de l'indoxyle.

Maintenant que nous en avons examiné les propriétés physiques et chimiques, nous allons étudier quelles sont les conditions *naturelles* ou *expérimentales* (1) qui président à l'apparition de l'indigurie.

Indigurie naturelle.

Dans l'état de parfaite santé ou dans des conditions pathologiques dont nous discuterons plus loin la signification, les urines, chez l'homme ou chez les animaux, peuvent présenter le phénomène de l'indigurie,

On dit qu'il y a *indigurie bleue* si la matière colorante dominante est l'indigotine, *indigurie rouge* si c'est l'indirubine. Mais l'urine peut prendre également une coloration mauve ou violette lorsqu'il y a mélange en proportions différentes de rouge et de bleu; elle peut également être verte, comme c'est le cas au début du phénomène, quand le bleu de l'indigotine se mêle à la teinte jaune naturelle de l'urine.

(1) Nous tenons, à cette place, à remercier très chaleureusement la *Badisch-Anilin und Soda-Fabrik* de l'offre généreuse qu'elle nous a faite de l'indol qui nous a été nécessaire pour mener à bien les expériences dont le présent travail est le résumé.

L'indigurie, quoique rare, s'observe de temps en temps, plus souvent chez l'homme que chez les animaux.

Déjà HIPPOCRATE et GALIEN avaient observé que l'urine peut prendre quelquefois une coloration bleu noirâtre et laisser déposer un sédiment de même couleur.

Ils ont également parlé d'urines rouges, dont l'intensité variait du rose jusqu'au rouge de feu.

Il est fait mention d'urines vertes et bleues dans les ouvrages de BELLINI (184) (1698), dans ceux de RÉGA (185) (1725) et d'ALPIN (186) (1751).

Dans la plupart des cas cités par ces auteurs les urines étaient colorées en vert et enfin en bleu. La couleur verte s'observe généralement lorsque l'urine commence à s'altérer; la petite quantité d'indigo qui se forme au début, donne, nous venons de le dire, une coloration verte résultant de sa dilution dans une grande quantité d'une urine très jaune. Pour les anciens auteurs, cette coloration verte, qui avait particulièrement frappé leur esprit, était due à un trouble des fonctions du foie, à un « défaut de coction de la bile ». Les urines bleues sont encore appelées *indiques*, à cause de leur couleur, qui est analogue à celle de l'indigo; les rouges, ou urines *irinées*, tirant ce qualificatif de ce que leur couleur les rapproche de celle de l'iris germanica.

En 1823, JULIA (187) cite deux cas où les urines étaient colorées en bleu et conclut en disant: « Il n'est pas étonnant qu'il existe, dans l'urine, de l'acide hydrocyanique à l'état salin, et peut-être même dans les urines vertes, dont la couleur pourrait être due à un moindre degré d'oxydation du fer, comme on voit des proto et deutosulfates de fer donner, par l'acide hydrocyanique, des précipités verts ou bleus. »

BRACONNOT (188) décrit deux cas dans lesquels la matière colo-

(184) BELLINI. De urinis et pulsibus, de missione sanguinis, de febris. Francfort 1698.

(185) RÉGA. De urinis, tractatus. . . . Voir *Journ. de chim. médic.*, 1, 330, 1825.

(186) ALPIN. De præsagienda vita. . . Venise 1751.

(187) JULIA. Mémoire sur l'existence de l'hydrocyanate de fer dans l'urine. *Archiv. gén. de médéc.*, 2, 104, 1823.

(188) BRACONNOT. Examen d'une matière colorante bleue particulière. *Annal. de physiq. et chim.*, 29, 251, 1823.

rante bleue était en suspension dans l'urine et se déposait par le repos.

Il a examiné les urines quelque temps après l'émission, et il n'y a qu'à lire ses communications pour se rendre facilement compte qu'il avait bien affaire à deux cas d'indigurie.

La matière bleue bien lavée paraissait plus foncée que le bleu de Prusse et renfermait en outre une substance rouge qu'il extrayait au moyen des acides ?

Pour BRACONNOT, la matière colorante des urines en question contient du fer et il l'assimile à une base salifiable organique qui proviendrait d'une transformation de l'acide urique.

C'était de l'indigotine qui constituait la couleur bleue obtenue par BOUCHARDAT (189) (1841) dans une urine, ou qui, associée à de l'indirubine, formait le sédiment trouvé par VON VELSEN (190) (1844) dans l'urine d'un individu atteint de cystite.

Pour BOUCHARDAT, la matière colorante paraît avoir pour origine la partie colorante du sang et mieux encore la matière albuminoïde des globules.

En 1847, SIMON cité par SEMMOLA (191) reconnaît déjà que les urines bleues peuvent renfermer de l'indigo. Il a trouvé que le dépôt de bleu fourni par une urine se dissolvait dans l'acide sulfurique pour donner de l'acide *sulfo-indigotique*, lequel se décolore par le glucose en solution alcaline pour reprendre sa coloration bleue par exposition à l'air.

LACHE (192), en 1848, a observé l'urine d'un garçon de 13 ans, souffrant d'une péritonite perforante, ne contenant ni pigments sanguins, ni matières colorantes de la bile, et qui à la filtration laissait une couche bleue assez épaisse. Il dit que ce fait ne se présente que très rarement, et ne spécifie pas si la coloration existait déjà à l'émission.

(189) BOUCHARDAT. Note sur une urine bleue. *Journ. de pharm. et chim.*, 2, 539, 1842.

(190) VELSEN. Coloration de l'urine en violet-foncé à la suite de l'usage de l'eau de chaux. *Journ. de chim. médic.* (2), 10, 342, 1844.

(191) SEMMOLA. Sur la cyanourine. *Journ. de Chim. médic.* (3), 3, 419, 1847.

(192) LACHE. *On the nature and treatment of stomach and renal diseases*. Londres, 1848.

PROUT, cité par GILCHRIST (193), en 1848, a signalé un cas très curieux d'indigurie chez un malade qui, chaque fois qu'il prenait du sel de Sedlitz, expulsait des urines laissant déposer un sédiment bleu foncé. Ce sédiment était tellement abondant dans un cas, qu'on put en faire l'analyse chimique. PROUT reconnut que ce corps n'était autre que de l'indigo, et qu'il dégageait par chauffage des vapeurs pourprées lesquelles se condensaient en un sublimé, comme cela a lieu avec l'indigo.

GUBLER (194, 195) en 1854, puis en 1869, signale la coloration bleue des urines chez des cholériques et des scarlatineux. Mais il ne saurait ici être question d'indigurie, car il obtint cette coloration en traitant l'urine par l'acide azotique. Un point doit cependant retenir notre attention, c'est que GUBLER considère la coloration bleue comme dérivant de la bile. Comme dans l'action de l'acide azotique sur la bile, on obtient la gamme des couleurs connues dans lesquelles on reconnaît le vert, dû à la biliverdine et le bleu, dû à la bilicyanine, « il est possible, dit GUBLER, que l'élément qui se colore en vert dans la bile ne soit pas éliminé par les urines, tandis que l'élément qui se colore en bleu soit éliminé et entraîné dans la sécrétion urinaire ».

C'est là une explication des plus fantaisistes. Nous ne l'avons rappelée que pour montrer qu'en 1869 on voulait, comme plusieurs siècles avant, faire jouer à la bile un rôle important dans la production des couleurs retirées de l'urine.

En 1869, LEVEN (196) montre des cristaux bleus extraits, mais il ne dit pas de quelle façon, d'une urine sanglante et albumineuse d'un enfant scarlatineux. Il s'agissait évidemment d'indigotine.

MÉHU en 1871, signale dans une urine la présence de deux matières colorantes : l'une rouge, soluble dans l'éther, l'alcool, le chloroforme, l'autre bleue, difficilement soluble dans le

(193) GILCHRIST. On Indigo in the Urine. *Edinb. medic. Journ.*, 7, 537, 1861.

(194) GÜBLER. Coloration bleue des urines chez les cholériques. *C. R. Soc. Biol.*, 6, 403, 1854.

(195) GÜBLER. A propos de la communication de M. Leven. *C. R. Soc. Biol.*, 21, 333, 1869.

(196) LEVEN. Cristaux bleus extraits d'une urine sanglante d'un enfant scarlatineux. *C. R. Soc. Biol.*, 21, 333, 1869.

chloroforme, mais soluble dans l'alcool bouillant et donnant par refroidissement de la solution des cristaux d'indigo.

Il n'est pas douteux que MÉHU eut affaire à un mélange de bleu et de rouge d'indigo. Un point doit cependant attirer notre attention : c'est la difficulté que MÉHU a eue à dissoudre le bleu dans le chloroforme. Nous pensons qu'on en doit trouver l'explication dans ce que :

1^o L'agitation d'une urine putréfiée avec du CHCl_3 donne lieu à une émulsion difficile à disloquer, au sein de laquelle le contact entre le dissolvant (CHCl_3) et la substance à dissoudre (indigotine) s'établit mal ;

2^o L'indigotine en cristaux bien formés est très peu soluble dans le CHCl_3 . Pour MÉHU, les urines à sédiments violets ne se rencontrent que dans les maladies graves (maladies de la moelle épinière.) C'est là une affirmation qui n'a pu être répétée par la suite.

NENCKI (197) en 1874, sous la dénomination de *Rothe indigurie*, parle d'une urine rouge brun qui, traitée par l'acide chlorhydrique fournit une matière colorante soluble dans l'alcool, l'acide acétique et qui chauffée donne un sublimat violet.

Comme NENCKI traitait son urine par un acide, il ne saurait être question ici d'indigurie au sens vrai du mot, puisque toutes les urines traitées par HCl peuvent fournir de l'indirubine.

DUBUYNE (198) a vu un malade expulser une urine bleue et reconnu que cette matière colorante n'était autre que de l'indigo.

Entre tous les travaux qu'ont suscités les urines bleues, alors que les notions chimiques n'étaient que peu développées, un des plus intéressants est celui de A. ROBIN (199.) Cet auteur admet dans les urines en question l'existence de trois couleurs bleues :

1^o La cyanourine, très rare, préexistant au moment de l'émission ;

2^o L'indigose, plus fréquente, se formant lors de la putréfaction ;

(197) NENCKI. Ueber die Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe und über die Pankreasverdauung. *Berichte*, 7, 92, 1874.

(198) DUBUYNE. *Oettinger Jahresber. f. Chem.*, 1, 1874.

(199) A. ROBIN. Note sur un cas d'urine bleue, considérations sur la nature probable de la matière bleue contenue dans certaines urines. *C. R. Soc. Biol.*, 27, 264, 1875.

3^e Une matière bleue qu'il ne qualifie pas, se développant par l'action des acides.

Ces trois couleurs sont évidemment toutes de l'indigotine, mais alors que la première et la deuxième dérivent de ce que nous appelons le chromogène indigurique, la troisième provient de l'indican même.

ROBIN, dans une deuxième communication (1879) (66), cite le cas d'un malade atteint de fièvre typhoïde grave dont les urines à l'émission étaient d'un jaune légèrement verdâtre. Au bout de quelques heures, elles sont en pleine fermentation, le reflet verdâtre s'est accentué et les urines sont devenues manifestement dichroïques; franchement vertes quand on les regarde par réflexion, rouge-verdâtre par transmission. Le lendemain, elles ont pris une coloration bleue très accusée et des particules brillantes d'un bleu pur sont venues flotter à la surface du liquide. Si on agite la liqueur avec 1/10 de son volume de chloroforme, ce dernier s'empare de la matière colorante en prenant une teinte rouge rubis; le bleu reste en suspension bien qu'il s'agisse là d'indigotine; nous ferons sur les difficultés à la dissoudre dans le CHCl_3 les mêmes réflexions que pour l'observation antérieure de MÉHU.

Le dichroïsme des urines « bleues » signalé par Robin doit être rapporté, nous le savons aujourd'hui, à l'indoxyle mis en liberté; mais au moment où ROBIN écrivait, on ne savait à quoi l'attribuer.

ROBIN estimait également que la matière colorante bleue pouvait provenir soit de l'oxydation de l'acide urique, ou encore de celle de l'indol, accordant ainsi son hypothèse avec un fait expérimental que NENCKI et KÜHNE venaient de signaler.

Depuis les communications de ROBIN, plusieurs cas d'indigurie ont été signalés, dont quelques-uns ne présentent pas d'intérêt bien spécial, ce sont ceux de WOLFF (200), KAHLER (201), BAGINSKY (202),

(200) WOLFF. *Ueber Indigurie*. Inaugur. Dissert., Berlin, 1887, 28 pages.

(201) KAHLER. Ein Fall von Indigurie. *Prager medic. Wochenschr.*, n° 50, 341, 1888, et *Jahresber. für Tierch.*, 13, 423, 1888.

(202) BAGINSKI. Zwei Fälle mit auftreten einerartiger Farbstoffe im Harn. *Archiv. für Kinderheilkunde*, 13, 312, 1892; *Centralbl. für medic. Wissenschaft.*, 30, 111, 1892.

GARROD (203). Ce dernier relate un cas d'urines vertes chez un enfant qui avait avalé un morceau de drap bleu. Pour lui, la coloration est due à de très fines particules de bleu en suspension dans l'urine jaune. Nous savons cependant depuis, que l'indigotine administrée en grandes quantités par la bouche ne peut pas passer dans l'urine.

FLETSCHER (204), GOOD (205) parlent d'urines bleues dont la source semble être du bleu de méthylène avalé d'une manière involontaire.

En 1866, LEUBE (206) cite le cas d'une urine d'un ostéomalacique souffrant d'une néphro-cystite, qui, par exposition à l'air, prenait une magnifique coloration violet foncé et dont l'intensité allait en augmentant de la surface vers la profondeur. Ce n'était point de l'indigotine, car l'urine agitée avec de l'éther laissait passer dans celui-ci une belle matière colorante rouge foncé; celle-ci était également soluble dans le chloroforme, l'alcool, la benzine, passablement soluble dans l'eau bouillante. Il s'agissait sans aucun doute d'indirubine souillée par des produits bruns.

Si nous citons l'observation de LEUBE, c'est pour relever sa conclusion inexacte. LEUBE, en effet, ajoute : « Il paraîtrait que l'urine de cysto-pyérite, lorsqu'elle est riche en indican soit capable de donner spontanément un dépôt d'indigo. »

Nous avons montré que les urines, quelle que soit leur richesse en indican, ne donnent dans aucun cas de précipitation d'indigo et que ce phénomène est dû à la décomposition d'un chromogène indoxylique autre que l'indican.

Dans ces dernières années, plusieurs cas d'indigurie bleue ou rouge ont été rapportés dont nous allons fournir succinctement les principales données en ne retenant que celles qui auront un intérêt plus particulier.

C'est à de l'indirubine que ROSIN (207) eut affaire en 1891, dans

(203) GARROD. A specimen of urine rendered green by Indigo. *Transact. Clin. Soc. London*, **28**, 307, 1895.

(204) FLETSCHER. Green coloured. *The Lancet*, **2**, 1176, 1898.

(205) GOOD. Blue Urin. *The Lancet*, **1**, 1333, 1901.

(206) LEUBE. Ueber einen neuen pathologischen Harnstoffe. *Archiv. für pathol. Anat.*, **106**, 418, 1886.

(207) ROSIN. Ueber das Indigorot. *Arch. für pathol. Anat.*, **123**, 336, 1891.

l'urine provenant d'un malade atteint de cystopyélite et qui, par une longue exposition à l'air, laissait déposer un sédiment violet. ROSIN a caractérisé la matière colorante comme étant de l'indirubine associée à un peu d'indigotine.

ROSIN ajoute : « Il semblerait que dans la putréfaction et sous l'influence des bactéries il y ait une action sur les composés de l'indoxyle, comparable à celle exercée par les réactifs chimiques. » Cette réflexion n'a d'intérêt qu'en ce que ROSIN a obtenu par la putréfaction un mélange de bleu et de rouge comme en donnent les acides qui dédoublent l'indican, mais là s'arrête sa signification, car les bactéries ne portent leur action que sur un seul conjugué de l'indoxyle, le chromogène indigurique; elles respectent, nous l'avons déjà dit, l'indican.

BOGODANOW-BERESOWSKI (208) cite le cas d'un néphritique, souffrant de diarrhée et de suppuration occasionnées par une plaie fistuleuse, qui rendait des urines, lesquelles après deux jours prenaient une couleur cerise foncé en se troublant. Le précipité desséché était bleu foncé, soluble dans le chloroforme et l'acide sulfurique concentré. La quantité d'indigo dosée s'élevait à 3 gr. 3 en vingt-quatre heures !! Chiffre qui est certainement erroné. Il est également invraisemblable qu'une urine si riche en dérivés indoxyliques ne donne pas, c'est BOGODANOW qui le dit, la réaction de l'indican.

PLOSZ (209), en 1882, avait déjà trouvé, dans un cas de cystopyélite une matière colorante cristallisée. L'urine fraîchement émise renfermait des cristaux de bleu d'indigo à côté d'une matière colorante rouge violacé. Mais au lieu d'extraire ces produits directement par les dissolvants neutres, Plosz traitait l'urine par l'acide chlorhydrique, évaporait et extrayait par le chloroforme et l'éther.

Dans un travail plus récent, Plosz communique d'autres observations. Mais, comme dans l'observation précédente, il additionne

(208) BOGODANOW-BERESOWSKI. Ein Fall von Indigurie. *St-Petersb. Medic. Wochenschr.*, 14, 59, 1897; *Jahresb. für Thierch.*, 27, 742, 1897.

(209) PLOSZ. Ueber einen neuen Kristallfarbigen Harnbestandtheile. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 6, 304, 1882.

l'urine de 10 % d'HCl et chauffe pendant vingt minutes à l'ébullition. Il procède ensuite comme ci dessus à l'extraction au moyen de l'éther ou du chloroforme. Les matières colorantes qu'il obtient dans ces conditions ne tiennent pas uniquement à l'indigurie probable, mais aussi à l'indican qui est décomposé par HCl. Pour Plosz, il n'y aurait aucun rapport entre l'indirubine et cette matière colorante qu'il appelle *urorubine*. L'urorubine en question est certes de l'indirubine; l'hypothèse de Plosz n'est donc nullement justifiée.

GRÖBER (211) cite le cas d'une jeune fille atteinte de néphrite et d'endocardite qui excretait des urines dont la teinte rouge foncé était due à la présence d'une matière colorante passant directement dans le chloroforme ou dans l'éther *sans addition préalable d'acide*; GRÖBER présume qu'il avait affaire à de l'indirubine.

Chose curieuse, GRÖBER dit n'avoir pas trouvé trace d'indican dans cette urine, ce qui ne paraît pas possible.

La même année paraissait dans le *Festschrift für Salkowski*, un travail de WANG (212), dans lequel cet auteur relatait un cas d'indigurie survenu chez un enfant souffrant de diarrhée et de tuberculose pulmonaire. Les urines recueillies par sondage de la vessie étaient brun foncé et renfermaient par jour jusqu'à 260 milligrammes d'indican. Par le repos et à l'air libre il se déposait un précipité bleu-violacé très abondant, et à l'autopsie le rein présentait sur les coupes macroscopiques une coloration nettement bleue et sur des coupes microscopiques des amas de matière colorante bleu-violacé.

WANG combat l'opinion émise par ROSIN et d'autres qui veulent toujours rattacher l'apparition spontanée du rouge à une pyélocystite.

MOUISSET et BONNAMOUR (213), dans un long travail, relatent un

(211) GRÖBER. Ein Fall von Indigurie mit Auftreten von Indigorot im frisch gelassenen Harn. *Müncher. medic. Wochenschr.*, n° 2, 1904.

(212) WANG. Ein Fall von Indigurie. *Festschr. für Salkowski*, 1, 397, 1904.

(213) MOUISSET et BONNAMOUR. Modification rare des urines dans le cours d'une dothiéntérie; urines de coloration normale à l'émission présentant un aspect rouge hémorragique après exposition à l'air : alcaptonurie probable. *Lyon Medical*, 30 avril 1903.

cas d'urine colorée en rouge intense qu'ils attribuent à de l'alcap-tone alors qu'ils ont affaire (il n'y a qu'à les lire pour s'en rendre compte) à un cas typique d'indigurie rouge.

MANN (214) cite le cas d'une urine renfermant une grande quantité de dérivés indoxyliques. L'urine, de réaction acide, possédait une couleur foncée, laquelle passait dans le chloroforme; le résidu de la solution chloroformique, donnait par chauffage des vapeurs violettes d'indigo.

MAILLARD a eu également l'occasion d'observer l'urine d'un homme ne souffrant d'aucune affection apparente et qui recevait une alimentation très carnée. Les urines de cet individu, après fermentation ammoniacale, laissèrent déposer des couleurs indigotiques en assez grande abondance.

CALCULS D'INDIGO

L'excrétion d'indigotine à l'émission, sans être mise en doute doit être très rare, et les cas où cette matière colorante est rassemblée sous forme de calculs vésicaux ou rénaux doit être encore plus rare.

HELLER (215) dit: on peut rencontrer de l'indigo sous forme de petits cristaux vésicaux.

ORD (216, 217) a trouvé beaucoup d'indigo, une première fois dans un calcul du bassinnet recueilli par BLOXAM et une seconde dans le calcul d'un rein envahi par une tumeur sarcomateuse.

CHIARI (218) a observé dans le rein d'une femme souffrant d'une pyélite purulente des concrétions d'indigo de même couleur et de même constitution que ceux décrits par ORD. Il observa en outre, que ces concrétions renfermaient, à côté de l'indigo bleu, une matière colorante rouge qui se dissolvait dans l'alcool destiné à conserver les calculs.

(214) MANN. Indigouria. *Médec. Chronicle*, 361, 1903.

(215) HELLER. Neue Farbstoff im Harn. *Archiv. der Pharm.*, 98, 203, 1847.

(216) ORD. Ueber Harnsteinbildung. *Berlin. klin. Wochenschr.*, 15, 363, 1878.

(217) ORD. Indigo calculus from the Kidney. *Transact. of the p. roy. Soc. of London*, 29, 133, 1878.

(218) CHIARI. Ueber sogenannte Indigosteinbildung in den Nierenkelchen und Becken. *Prager. medic. Wochenschr.*, 13, 543, 1888.

ULTZMANN (219) dit : « il y a des calculs des voies urinaires renfermant de grandes quantités d'indigo et qui doivent être considérés comme des calculs indigotiques, mais ils sont très rares ».

Nous avons eu l'occasion nous-même d'étudier plusieurs calculs rénaux colorés de l'homme, du cheval et du chien, sans qu'il fut possible de décèler la moindre trace de couleurs indigotiques. Les calculs rénaux de chien étaient cependant fortement colorés en bleu-vert, mais ils ne renfermaient que des pigments biliaires fixés sur trame cristalline de xanthine.

Indigurie naturelle chez les animaux.

L'indigurie *spontanée*, constatable à l'émission, n'a jamais été signalée chez les animaux ; pour notre part, nous ne l'avons jamais observée.

Mais par contre, il est fréquent d'observer ce phénomène consécutivement à la putréfaction de l'urine chez le cheval, l'âne et la chèvre.

Il suffit parfois de laisser des urines de cheval sain exposées à l'air et à la putréfaction dans des capsules de porcelaine pour voir souvent ces liquides se recouvrir d'une fine pellicule irisée d'indigo, en même temps que sur les parois des capsules se dépose un enduit bleu ou bleu rougeâtre d'indigotine.

BENJAMIN (220) en cite un exemple fort remarquable qui ne paraît en aucune façon être sous la dépendance d'une affection quelconque. L'urine était absolument différente de celle obtenue dans les cas d'hématurie, et s'en distinguait par une coloration bleuâtre assez foncée. A. ROBIN, qui examina cette urine, la dit fortement chargée en *indigose* et la classe dans les urines bleues ; il lui donne, comme cause, une influence alimentaire ou digestive

Chez la chèvre, avec M. PORCHER, nous avons souvent eu l'occasion de constater la formation, le lendemain de l'émission, d'un sédiment rouge en même temps que l'urine prenait une teinte

(219) ULTZMANN. *Harnconcrementen des Menschen und die Ursachen ihrer Entstehung*. Wien 1882.

(220) BENJAMIN. Sur la coloration anormale de l'urine de cheval. *Recueil de Méd. vétérin.*, 7, 490, 1880.

uniformément rouge, due à de l'indirubine qu'on peut extraire facilement par agitation avec l'éther ou le chloroforme.

A son tour, le sédiment desséché, puis traité par le chloroforme, passe dans ce dissolvant en le colorant en rouge.

CAUSES DE L'INDIGURIE NATURELLE

L'indigurie, ou production d'indigo bleu et rouge, avec prédominance de bleu dans l'indigurie bleue, de rouge dans l'indigurie rouge, se produit dans les urines en train de s'altérer. Elle est due à une mise en liberté d'indoxyle, dont on n'avait pas toujours bien saisi l'existence transitoire, lequel s'oxyde au contact de l'air pour donner de l'indigo.

Cet indoxyle ne saurait provenir — ce que beaucoup d'observateurs ont pourtant avancé — de la décomposition putréfactive de l'indican des urines. Si cela était, l'indican étant un principe normal des urines, celles-ci, quelles qu'elles soient, devraient, lors de leur altération, donner du bleu ou du rouge d'indigo.

Or cela n'est pas, et en somme, l'indigurie est un phénomène assez rare. Il doit donc correspondre à l'existence dans l'urine de quelque chose de particulier, d'une forme conjuguée de l'indoxyle permettant aisément la mise en liberté de celui-ci.

WOLFF ne disait-il pas dans un travail récent: « A cause de la rareté des cas, il n'est pas possible jusqu'à présent de se prononcer sur la cause de l'indigurie. Aussi longtemps que la cause ne sera pas connue, son importance diagnostique n'aura qu'une valeur insignifiante. »

Avant de montrer que cette cause n'est plus inconnue, nous allons exposer les expériences qui nous ont permis de réaliser le phénomène de l'indigurie.

Indigurie expérimentale.

Lorsqu'on administre à un animal, sous la peau ou par la bouche, *une petite quantité d'indol*, celui-ci est éliminé par l'organisme sous la forme d'indican urinaire.

Il devenait particulièrement intéressant de rechercher ce que

donnerait l'administration par les mêmes voies de *fortes doses d'indol*.

A priori, il est logique de supposer que l'éthérification par l'acide sulfurique ait des limites et, dès l'instant où le soufre destiné à être éliminé sous la forme sulfurique (sulfates libres, éthers sulfuriques) viendra à être insuffisant, on peut se demander si l'indol ingéré en grandes quantités ne passera pas dans l'urine avec un aspect différent de l'indican. En effet, lorsque la quantité d'indol administrée par la bouche est assez forte : 1 gramme, 1 gr. 50, 2 grammes, les urines rejetées quotidiennement sont le siège de phénomènes particuliers ne ressemblant pas à ceux que présentent les urines ordinaires peu riches en dérivés indoxyliques.

Les urines émises après l'administration de faibles quantités d'indol, conservées à l'air libre, ne tardent évidemment pas à s'altérer, mais elles subissent la fermentation ammoniacale et se troublent sans changer sensiblement de couleur. Au contraire, lorsqu'elles font suite à l'ingestion de 1 à 2 grammes et même plus d'indol, on observe le phénomène de l'indigurie.

Nous avons opéré sur deux types d'animaux différents : le chien et la chèvre. Il serait fastidieux et inutile de relater ici toutes nos expériences, dont le nombre dépasse cinquante.

Nos expériences chez le chien ont toujours été faites après que ces animaux avaient été soumis, plusieurs jours auparavant, au régime de la soupe au pain. On sait que, dans ces conditions l'urine ne renferme que des traces de composés indoxyliques.

Avec la chèvre, il ne nous a pas été possible d'opérer de la même façon, car on ne peut pas parvenir à débarrasser l'urine de cet animal des chromogènes d'origine indolique et d'origine scatolique qu'elle contient normalement, mais les résultats obtenus n'en ont pas moins été des plus caractérisés.

L'indigurie expérimentale peut être réalisée également avec l'indoxyle libre, l'acide indoxylcarbonique, l'acide orthonitrophénylpropiolique donnés en ingestion.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES

Dans nos expériences avec des doses d'indol de 1 à 2 grammes, nous avons vu que jamais ce composé passe en nature dans

l'urine. L'urine fraîchement émise, agitée dans un entonnoir à robinet avec de l'éther ou du benzène bien dépourvu de thiophène, ne cède à l'un ou à l'autre de ces dissolvants rien qui réagisse avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde; cependant, avec des doses plus considérables, si nous avons vu apparaître l'indol dans les urines, cela n'a jamais été que rarement et en très faibles proportions.

Généralement, l'indigurie du chien est bleue, celle de la chèvre est rouge. Mais, nous ne saurions trop le répéter, il ne saurait s'agir ici d'une règle générale, sans inflexibilité, et, à l'indigurie rouge du début chez la chèvre fait le plus souvent suite une indigurie bleue.

Chez l'homme, dans les conditions de la clinique, comme chez le chien au point de vue expérimental, c'est principalement l'indigo bleu qui se forme.

La première urine, émise dans les trois à quatre heures qui suivent l'administration d'indol, donne déjà le phénomène de l'indigurie, mais celui-ci est plus marqué avec l'urine émise six à sept heures après. Bien entendu, il n'est pas facile de donner à cet égard des chiffres précis; ils sont en effet essentiellement variables et dépendent de la quantité d'indol ingérée, du poids de l'animal en expérience et de l'état de l'intestin, sans compter quelques autres facteurs qui nous échappent encore.

L'indol (2 grammes le plus souvent) était administré le matin, vers 8-9 heures. Bien que l'urine de la nuit suivante fût moins indigurique que celle de l'après-midi, elle se prêtait encore admirablement à la production du phénomène auquel les anciens auteurs rattachaient les urines « bleues », et voici en détail ce que l'on observe :

L'urine émise, recueillie dans une éprouvette, est laissée exposée à l'air. Ensemencée par les bactéries de l'atmosphère, elle ne tarde pas à s'altérer, mais l'indigurie ne se manifeste d'abord que dans la couche superficielle en contact avec l'air. Cette partie se fonce, verdit, puis bleuit, en se recouvrant d'une pellicule d'indigotine, aux reflets caractéristiques; la couche en question finit par atteindre 2 à 3 centimètres d'épaisseur et s'estompe dans le bas en pénétrant dans les couches profondes.

En résumé, voici ce qui s'est passé : le chromogène indigurique

s'est dédoublé lors de l'altération de l'urine, en mettant en liberté de l'indoxyle, lequel, au fur et à mesure de sa production, donnait de l'indigo en s'oxydant au contact de l'air.

Mais, si dans les couches profondes, qui n'ont pas le contact de l'oxygène atmosphérique, la formation d'indigo est entravée, le dédoublement du chromogène indigurique ne s'en poursuit pas moins. Aussi l'indoxyle est-il abondant en ces points et il communique à l'urine le dichroïsme qui le caractérise : le liquide, qui est jaune par transparence, est d'un très beau vert par réflexion.

C'est la première fois qu'on signale ainsi la présence d'indoxyle libre dans des urines rendues indiguriques expérimentalement.

Il est intéressant de répéter sur les couches profondes de l'urine précédente contenant de l'indoxyle, et nullement encore de l'indigo, les expériences qu'on réalise avec l'indoxyle obtenu au laboratoire par décomposition de l'acide indoxylcarbonique.

En soutirant une partie de cette urine avec précaution dans une atmosphère de gaz d'éclairage, on peut la conserver sans qu'il se forme d'indigo, et en agitant une autre portion avec de l'alcool amylique, celui-ci s'empare de l'indoxyle en montrant une fluorescence des plus marquées ; la solution amylique, à son tour, agitée avec de la potasse, bleuit instantanément par formation rapide d'indigotine.

D'ailleurs, la même expérience peut être réalisée sur l'urine non traitée par l'alcool amylique. On en fait arriver doucement dans un tube à essais par siphonage, puis on verse goutte à goutte, dans le liquide, une solution de potasse. Dans ces conditions, là où la goutte tombe et se dilue dans la masse, il se fait de l'*indirubine*, comme cela s'observe d'ailleurs avec la solution aqueuse d'indoxyle obtenu en partant de l'acide indoxylcarbonique, et ce n'est qu'en agitant vigoureusement, après avoir versé quelques gouttes de potasse, que l'on voit l'indigotine se former rapidement.

Cette dernière réaction nous fait comprendre pourquoi il est difficile de définir les conditions d'apparition, soit de l'indigo bleu, soit de l'indigo rouge, puisque l'indoxyle obtenu en partant de l'acide indoxylcarbonique même donne du rouge d'abord, du bleu ensuite, quand on verse un alcali dans sa solution aqueuse. On conçoit donc, ainsi que nous l'avons déjà dit, que toute hypo-

thèse sur la formation de l'indigo, qu'il soit bleu ou rouge, à partir des urines à indigurie, ne peut être que des plus hasardées.

D'ailleurs, un même chien soumis à un régime invariable nous donnera des urines qui, d'emblée, aujourd'hui deviendront franchement bleues et qui demain seront d'abord rouges avant de virer au bleu.

Ce que l'expérience nous permet seulement de dire, c'est que, dans les cas où l'indigurie, qu'il s'agisse du chien ou de la chèvre, commence par être rouge, elle finit toujours par devenir bleue.

A un moment où nous pensions que la réaction de l'urine pouvait avoir une influence sur l'obtention de l'un ou l'autre des indigos, nous avons fait prendre à l'animal d'expérience (chien), en même temps que l'indol, plusieurs grammes d'acétate de sodium. Les urines émises furent très alcalines, mais l'indigurie ne fut pas différente de ce qu'elle était les fois précédentes; elle fut bleue, comme dans les expériences antérieures réalisées chez le même animal, dont les urines avaient alors la réaction ordinaire.

Après ce qui vient d'être dit, on peut donc se demander si la recherche des causes d'apparition, soit du bleu, soit du rouge, est vraiment d'un grand intérêt. Y a-t-il, comme NENCKI le pense, deux chromogènes: l'un pour l'indigo bleu, l'autre pour l'indigo rouge; cela nous paraît peu probable.

Jamais, chez des animaux sains, dont l'appareil urinaire est par conséquent intact, l'émission d'urine après ingestion forte d'indol n'est accompagnée d'indigo bleu ou rouge. En d'autres termes, *le chromogène ne se décompose qu'après l'émission.*

La constatation de ce fait exige que l'on s'entoure de précautions minutieuses, parce que l'apparition de l'indigo est quelquefois assez rapide après la miction. Nous avons vu des urines qui, au bout de trois heures, verdissaient déjà. Ce verdissement est dû au mélange de la couleur jaune de l'urine et de la couleur bleue de l'indigo, qui, avant de précipiter, semble affecter une forme colloïdale. En cet état, en effet, les urines, jetées sur plusieurs doubles de papier filtre, passent en conservant leur teinte verte, et le filtre, en séchant, se colore rapidement en bleu.

Avec les urines indiguriques, le dépôt d'indigo se forme surtout à la surface du liquide. En outre, il est évident que plus une urine sera riche en chromogène, et plus l'élévation de la température

extérieure favorisera les fermentations, plus vite l'indigo se formera.

La rapidité de décomposition du chromogène indigurique avec formation consécutive d'indigo nous explique pourquoi, tout au début de nos expériences, nous avons cru à la possibilité de l'émission d'urines vertes. A ce propos, d'ailleurs, nous nous permettons d'insister sur quelques points de détail, car nous estimons qu'ils ne sont pas superflus.

En effet, si bien agencée que soit une cage destinée à recueillir les urines, la déclivité du fond en zinc n'est pas telle que tout puisse s'écouler jusqu'à la dernière goutte. Il en résulte qu'une mince couche d'urine reste en quelque sorte collée au fond de la cage; l'infection du milieu et la grande surface offerte à l'oxydation font que très rapidement cette mince couche s'altère en donnant de l'indigo, qu'une miction ultérieure viendra balayer. L'urine rejetée prendra une couleur verte par mélange de sa teinte naturelle avec celle de l'indigo qu'elle aura entraîné. On sera donc tenté de croire que l'animal aura émis des urines vertes, que le dédoublement du chromogène urinaire aura été effectué dans son organisme même, alors qu'il n'en est rien. Pour éviter toute interprétation erronée, il faut laver le fond de la cage avec une solution antiseptique (cyanure de mercure à 1 %) et recueillir les urines dans un vase contenant un peu de chloroforme. Dans ces conditions, jamais nous n'avons observé d'urines vertes ou bleues à l'émission.

Si l'absorption d'une dose exagérée d'indol est un des facteurs de la production expérimentale de l'indigurie, il résulte également de ce qui a été dit antérieurement que l'altération de l'urine est une condition non moins indispensable de l'obtention de ce phénomène. Il est facile de le prouver.

On administre à un chien ou à une chèvre une forte dose d'indol. De l'urine émise, on fait plusieurs parts: l'une sert de témoin et est laissée exposée à l'air pour qu'on y observe la production d'indigo; les autres sont traitées de la façon suivante :

a) La première urine est stérilisée à l'autoclave à 125°, pendant vingt-cinq minutes;

b) La deuxième est filtrée sur bougie Chamberland, dans un ballon de Krebs stérilisé;

c) La troisième est additionnée de cyanure de mercure (cyanure à 1 %, à 1 cc. Urine : 10 cc.) ;

d) La quatrième est additionnée d'un peu de fluorure de sodium.

Les tubes *a*, *b* restent indéfiniment inaltérés ; il en est de même du tube *c*, qui, deux mois après, est encore intact, bien qu'au fond s'y trouve rassemblé un dépôt mercuriel grisâtre. Quant au tube *d*, la quantité de fluorure n'a servi qu'à retarder la formation d'indigo. Il est certain qu'une forte proportion de fluorure se serait opposée à l'altération de l'urine et conséquemment à l'apparition d'indigo.

L'urine stérilisée à l'autoclave, ainsi que celle qui a été filtrée sur bougie Chamberland, se rechargent d'indigo lorsqu'on les réexpose à l'air.

Il n'est donc pas douteux que le dédoublement du chromogène indigurique se rattache à l'altération de l'urine, qui, elle-même, est sous la dépendance d'un ensemencement par des germes qu'il reste à classer.

Ce fait était d'ailleurs connu depuis longtemps : nos expériences lui ont donné la preuve scientifique qui lui restait à acquérir.

L'indigurie marche plus vite en été qu'en hiver, en raison de la température plus élevée.

L'élimination du chromogène indigurique est assez rapidement terminée. Dans toutes nos expériences, les urines émises trente à trente-six heures après la prise de 2 grammes d'indol ne devenaient plus indiguriques ; elles renfermaient cependant encore de l'indoxyle conjugué, mais celui-ci affectait la forme d'indican.

Nous allons examiner maintenant quelques-unes des réactions présentées par les urines indiguriques, avant leur altération, sous l'influence des réactifs usuels.

1° La stérilisation à l'autoclave de ces urines en présence d'une faible quantité de soude, suffisante pour rendre les liqueurs franchement alcalines, n'engendre aucune modification apparente du chromogène.

2° Les urines indiguriques, quoique très riches en composés indoxyliques, ne sont cependant pas de celles qui bleuissent rapidement lorsqu'on les additionne à froid de leur volume d'acide chlorhydrique pur ; c'est d'ailleurs là un fait qui doit être bien

connu de tous ceux qui s'occupent des pigments urinaires d'origine indolique.

Il est des urines, urine d'homme faisant suite à un régime carné, ou encore urine de cheval, qui, additionnées de leur volume d'acide chlorhydrique fumant, foncent très rapidement et deviennent bleu noirâtre, avant même qu'on leur ajoute un oxydant : H^2O^2 , perchlorure de fer, etc.

Au contraire, si l'on s'adresse aux urines à indigurie, l'addition de leur volume d'HCl ne provoque pas ce bleuissement de la masse dont nous venons de parler; l'indoxyle est cependant libéré de sa conjugaison, mais ce n'est qu'en ajoutant l'oxydant, une goutte d'hypochlorite alcalin par exemple, qu'on provoque l'apparition rapide et abondante d'indigo bleu. Sinon la liqueur prend une coloration jaune brun, et en l'agitant avec de l'alcool amylique ce dissolvant s'empare de l'indoxyle en affectant un dichroïsme plus ou moins marqué.

3° L'acétate neutre de plomb ne précipite pas le chromogène indigurique, alors que l'azotate mercurique le précipite presque intégralement; entre ces deux réactifs se place l'acétate basique de plomb qui le précipite en partie.

Cela nous donne l'explication d'observations répétées que nous avons faites antérieurement, avec l'urine de cheval notamment. On sait en effet que l'indican n'est pas précipité par l'acétate basique de plomb; mais il nous est cependant arrivé d'obtenir, par l'extrait de Saturne avec l'urine de cheval, des précipités qui, bien que soigneusement lavés, contenaient manifestement de l'indoxyle conjugué.

Or, les urines des solipèdes présentent souvent, mais d'une façon atténuée, le phénomène de l'indigurie; il n'est pas rare de les voir se recouvrir d'une pellicule irisée, laquelle est un mélange d'indigotine et d'indirubine. Aussi nous semble-t-il rationnel de conclure que, si des urines de cheval déféquées par l'acétate basique de plomb laissent dans le précipité une portion d'indoxyle conjugué, celui-ci doit être rattaché au chromogène indigurique qu'elles contenaient.

INDIGURIE EXPÉRIMENTALE APRÈS ADMINISTRATION D'INDOXYLE

Administration d'indoxyle. — L'indoxyle est obtenu par la décomposition à l'ébullition, dans un gaz inerte, de l'acide indoxylrique mis en suspension dans l'eau. On obtient ainsi une huile brunâtre que nous avons administrée chez le lapin, le canard et le chien, soit sous la peau, soit par la bouche. Nous avons observé que l'indoxyle ne présente pas la toxicité que nos premières expériences nous avaient laissé supposer; et encore faut-il faire entrer en ligne de compte le mode d'administration.

Un lapin qui a reçu 1 demi-gramme sous la peau est mort au bout de vingt-quatre heures; un témoin qui a reçu la même dose par la bouche n'a eu aucun malaise.

Injecté sous la peau, l'indoxyle diffuse rapidement, en formant, comme dans le cas de l'acide indoxylrique, une large tache bleue d'indigotine qui imprègne les tissus tout autour et assez loin du point d'injection.

Des-chiens qui ont reçu 0 gr. 5 à 1 gramme d'indoxyle, par la bouche, n'ont présenté aucun phénomène toxique. Leur urine était riche en conjugués indoxylriques; elle fut indigurique.

INDIGURIE EXPÉRIMENTALE APRÈS ADMINISTRATION D'ACIDE INDOXYLIQUE

L'acide indoxylrique a été administré soit sous la peau, en émulsion très fine dans l'eau aiguisée de très peu d'alcool, soit par la bouche avec un peu d'huile. Nous avons opéré avec le lapin et le chien auxquels des doses de 0 gr. 5 pour le premier, de 1 à 2 grammes pour le second ont été administrées sans donner lieu à des phénomènes toxiques.

Quand on injecte l'acide indoxylrique sous la peau, l'urine émise ne contient que fort peu de dérivés indoxylriques. En effet, presque tout l'acide s'est décomposé, au contact des tissus sous-dermiques, avec production consécutive d'indigotine qui imprègne ces derniers et forme tout autour du point d'injection une large tache débordante bleu foncé, qui est visible à travers le tégument non pigmenté (6).

Si l'acide indoxylrique est administré par la bouche, l'urine

recueillie après l'ingestion est foncée, brunâtre, fluorescente. Elle ne contient cependant pas d'indoxyle libre, mais elle est très riche en chromogènes indoxyliques; elle donne lieu, chez le chien, au phénomène de l'indigurie, pour les doses de 1 à 2 grammes.

QUELLES SONT LES CAUSES DE L'INDIGURIE ?

Nous pensons que ce sont les causes et non la cause qu'il faut dire, car la réponse diffère suivant le point de vue auquel on se place.

Du côté clinique, nous n'obtenons à la question posée que des réponses évasives, incertaines, contradictoires que nous discuterons plus loin lorsque nous étudierons la signification de l'indoxyle urinaire.

Du côté chimique il est peut-être possible d'être un peu plus précis. Deux hypothèses peuvent en effet être formulées :

1^o Ou il y a eu excès d'indol fabriqué dans l'intestin et conséquemment pas assez de soufre convenable pour l'éthérification sulfurique de l'indoxyle;

2^o Ou bien la quantité d'indol libérée dans l'intestin n'étant pas excessive, il y a insuffisance notoire de cette éthérification sulfurique.

La deuxième hypothèse nous paraît la plus plausible, car il nous semble difficile d'admettre que l'homme soit capable d'élaborer dans son intestin des doses d'indol aussi fortes que celles qui nous ont été nécessaires, pour engendrer le phénomène de l'indigurie chez nos animaux d'expériences.

C'est donc l'insuffisance de l'éthérification sulfurique qu'il faut particulièrement envisager. D'ailleurs, BAUMANN et BRIEGER avaient déjà remarqué que l'administration prolongée de fortes doses d'indol amène rapidement la diminution des sulfates libres de l'urine.

A un chien, ils donnent 18 grammes d'indol en cinq jours, les trois premiers jours, 3 grammes, le quatrième, 4 grammes, le cinquième, 5 grammes. Les sulfates étaient déjà diminués dès le premier jour de l'administration. L'urine recueillie après le cinquième jour en était tout à fait exempte.

Il est facile de donner une rationnelle explication de cette cons-

tation expérimentale. Le soufre, qui s'éliminait antérieurement sous la forme de sulfates libres, ayant été employé pour la conjugaison de l'indoxyle, se retrouve dans l'urine, dans l'éther sulfurique de l'indoxyle. Mais comme à son tour il ne peut suffire à éthérifier tout l'indoxyle correspondant à l'indol, lorsque la sulfo-conjugaison est épuisée, il se fait alors une glycuco-conjugaison donnant lieu à la production du chromogène indigurique.



ORIGINE PHYSIOLOGIQUE DE L'INDOL

Dans les premiers chapitres, nous avons plus particulièrement étudié la nature chimique des transformations que subit l'indol dans l'organisme, pour s'éliminer par l'urine sous forme de chromogènes aujourd'hui bien connus.

Nous allons examiner maintenant — et c'est par là que nous finirons ce travail — quelle est l'origine physiologique de l'indol.

A l'heure actuelle, on admet que l'indol peut provenir de deux sources différentes :

1^o Il serait fabriqué dans l'intestin par quelques bactéries aux dépens d'aliments azotés convenables, ou dans les cavités purulentes par les microbes pyogènes ;

2^o Il résulterait de la désintégration normale des matériaux protoplasmiques de toutes nos cellules.

L'origine de l'indol est dite *externe* dans les premiers cas, *interne* dans le second.

Voici quel est le plan que nous allons adopter pour cette partie de notre travail :

Origine externe de l'indol	L'intestin est le siège normal de production de l'indol.	A. — Existence normale de l'indol dans l'intestin chez les mammifères domestiques ; recherche de l'indol chez les autres animaux (oiseaux, insectes, reptiles).
		B. — Mode de formation de l'indol.
		α. Aux dépens de quelles matières se forme-t-il ?
		β. Grâce à quels microbes ?
		C. — Comment influencer sur la produc- tion intestinale de l'indol ?
		α. Influence des antiseptiques intes- tinaux.
		β. Influence de l'alimentation.
		γ. Influence du jeûne.
	Formation de l'indol dans les abcès.	
Origine interne de l'indol . . .		A. — Arguments et expériences qui plaident en sa faveur. Leur critique.
		B. — Arguments et faits qui vont à l'encontre de cette hypothèse.
Conclusion		De la signification de l'indoxyle uri- naire.

L'examen des faits et des expériences portant sur l'origine *externe* de l'indol ne pouvant être fait sans que nous visions en même temps ce qu'on entend par l'origine *interne* de ce corps, on conçoit que la démarcation qui paraît nettement tranchée dans le programme succinct qui précède ne sera le plus souvent pas maintenue.

En effet, les arguments en faveur de la première pouvant généralement s'opposer à la seconde, une comparaison s'impose forcément à chaque instant entre l'origine *externe* et l'origine *interne* de l'indol ; cela facilitera l'exposé du sujet.

A. — Présence de l'indol chez les mammifères.

Dans les conditions ordinaires de l'alimentation propre à chaque espèce, l'indol se rencontre *constamment* dans le tube digestif de tous nos animaux domestiques. Il est très rationnel d'étendre la même observation aux autres mammifères non domestiques.

Si les animaux mammifères sur lesquels ont porté nos examens sont assez nombreux et comprennent le *chien* et le *chat* comme carnivores, le *porc* comme omnivore, le *cheval*, l'*âne*, le *bœuf*, le *mouton*, la *chèvre*, le *lapin* et le *cobaye* comme herbivores, nos investigations expérimentales ont plus particulièrement intéressé le chien, le cheval et la chèvre.

L'indol a été généralement recherché dans l'extrait benzénique du contenu intestinal ou des excréments.

La coloration de la liqueur benzénique, plus particulièrement marquée lorsqu'on s'adresse aux herbivores dont les résidus alimentaires intestinaux sont encore riches en chlorophylle ou en produits en dérivant, peut gêner, tout au moins au début, lorsqu'on n'en a pas l'habitude, la réaction avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde ; aussi est-il préférable d'opérer autrement.

Le contenu intestinal ou les excréments sont délayés dans l'eau et l'indol qui s'y trouve est entraîné par un vif courant de vapeur d'eau ; les eaux de condensation sont agitées ensuite avec du benzène ou de l'éther, dissolvants dans lesquels l'indol se rassemble.

La présence constante de l'indol dans l'intestin des animaux dont nous venons de parler est un fait qu'on peut dire depuis longtemps connu, car il dérive implicitement de cet autre fait, affirmé par de nombreux auteurs et aujourd'hui classique, *que l'indoxyle urinaire est un élément constant des urines de ces mêmes animaux.*

Entre tous les mammifères domestiques, ce sont surtout les grands et les moyens herbivores : cheval, bœuf, chèvre et mouton, qui fabriquent le plus d'indol dans leur intestin ; ce sont également eux qui, pour cette raison, ont les urines les plus riches en

indoxyle urinaire, ainsi que l'avait déjà constaté JAFFÉ (221), il y a trente-six ans.

Le contenu intestinal de l'homme, des omnivores en général, et des carnivores, renferme de l'indol d'une façon notable, surtout lorsque leur alimentation est riche en viande.

En ce qui concerne le chat, nous rappellerons que ROSENFELD (222) n'avait pas pu, à l'aide de la paradiméthylaminobenzaldéhyde, ~~déc~~éceler la présence d'indol dans le contenu intestinal de cet animal, même lorsque l'alimentation était riche en albuminoïdes. Mais le résultat négatif de ROSENFELD fut controuvé peu après par ELLINGER (223), qui mit en évidence, sans grandes difficultés, l'indol dans les fèces des chats.

En ce qui concerne les rongeurs herbivores de laboratoire (lapins, cobayes), nous nous sommes assuré, contrairement à ce qu'avancait ROSIN (224), que leurs urines renfermaient le plus souvent des dérivés indoxyliques : partant, dans leur intestin, il se fabrique de l'indol.

Si à la vérité, on a quelquefois nié, notamment HARNACK (225), après ROSIN, la présence de l'indican dans l'urine de lapin, c'est que cet animal recevait surtout une alimentation riche en hydrates de carbone (navets, carottes). Les meilleures conditions se trouvaient réunies, ainsi que nous le verrons, pour qu'il ne se forme que peu ou point d'indol dans l'intestin de cet animal.

Les différences notées par les auteurs qui ont étudié l'urine de lapin au point de vue de l'indoxyle, tiennent à des variations dans le régime alimentaire. Nous avons normalement observé de l'indicanurie chez cet animal nourri avec de l'herbe et des grai-

(221) JAFFÉ. Ueber Ursprung des Indikans. *Centralbl. für medic. Wissenschaft.*, 1, 2, 1872.

(222) ROSENFELD. Die Indolbildung bei hungernden Kaniichen. *Beitrag. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 5, 83, 1903.

(223) ELLINGER. Die Indolbildung und Indikansausscheidung beim hungernden Kaninchen. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 39, 44, 1903.

(224) ROSIN. Ueber das Indigorothe. *Archiv. für pathol. Anatom.*, 123, 336, 1891.

(225) HARNACK. Ueber Indikanurie im Folge von Oxalsäurewirkung. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 29, 203, 1900.

nes. DENIGÈS (227, 228, 229) vient de confirmer nos observations.

Chez la *grenouille*, nous avons, avec MM. PORCHER et GAUTIER, noté la présence de l'indol dans le tube digestif, uniquement lorsque cet animal était nourri avec des détrit^{us} carnés.

Les quelques recherches que nous avons faites chez la sauterelle, les mollusques, huîtres, limaces rouges, ne nous ont donné aucun résultat, mais il y aurait, croyons-nous, quelque intérêt à les poursuivre.

Nous terminerons ce court chapitre en faisant observer que le scatol accompagne constamment l'indol dans tous les cas où nous avons trouvé celui-ci, mais les proportions relatives de ces deux composés nous semblent des plus variables.

Nous appellerons également l'attention sur le fait important que voici :

S'il est très facile de mettre en évidence l'indol dans les excréments de l'homme et du chien, par exemple, il n'en est pas toujours ainsi avec le cheval et la vache, pour ne citer que ces deux herbivores. Et cependant ces animaux libèrent beaucoup d'indol dans leur tube digestif, ainsi qu'en fait foi la forte élimination d'indican dans leurs urines.

Cela tient à ce que les excréments des herbivores sont très poreux, relativement friables, et conséquemment, jusqu'à leur sortie même par l'anus, ils laissent facilement résorber par la muqueuse digestive les produits cristalloïdes qu'ils peuvent renfermer.

Au contraire, le contenu intestinal de l'homme et du chien, dans les dernières portions du tube digestif, se tasse en se recouvrant d'un enduit visqueux, gluant, et forme une masse qui, n'ayant nulle tendance à la désagrégation, ne laisse résorber que les produits de la surface. Les matières excrétées pourront donc encore contenir en leur centre une proportion assez notable d'indol, qui, si elle avait pu être absorbée, comme cela est facile chez

(227) DENIGÈS. Nouveaux réactifs de l'indol. *C. R. Soc. Biol.* **64**, 293, 1908.

(228) DENIGÈS. Sur la recherche de l'indol par les réactions de Legal et d'Ehrlich. *C. R. Soc. Biol.* **64**, 295, 1908.

(229) DENIGÈS. Sur la présence de produits actifs sur l'indol dans le benzène commercial et ses homologues. *C. R. Soc. Biol.* **64**, 296, 1908.

les herbivores, serait venue augmenter d'autant la proportion de l'indoxyle urinaire.

B. — Origine de l'indol.

L'existence constante de l'indol dans le tube digestif des mammifères étant un fait acquis, il reste à savoir :

- 1^o Comment ce composé est réparti dans les diverses parties du canal intestinal ;
- 2^o Quel est le mécanisme de sa formation.

MODE DE RÉPARTITION DE L'INDOL DANS LE TUBE DIGESTIF

On peut aborder l'étude de cette question de plusieurs façons. La plus simple est de faire des prélèvements de contenu intestinal dans les diverses parties du tube digestif, immédiatement après la mort. On peut encore, comme JAFFÉ (230) l'a fait, isoler par des ligatures des portions différentes du canal intestinal.

Enfin, de l'observation clinique, il est possible de tirer certaines déductions intéressantes.

Les recherches de JAFFÉ ont été reprises plus récemment par ELLINGER et PRUTZ (231) qui sont arrivés aux conclusions suivantes :

- 1^o Une stase dans l'intestin grêle augmente considérablement l'indican dans l'urine ; la stase dans le gros intestin n'a aucune influence ;
- 2^o S'il se produit dans une stase du gros intestin une abondante excrétion d'indican, on peut assurer que cette stase s'est compliquée d'une stase dans l'intestin grêle ;
- 3^o La stase du duodénum et de la partie antérieure de l'intestin grêle ne s'accompagne pas d'indicanurie.

(230) JAFFÉ. Ueber die Ausscheidung des Indikans unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen. *Arch. für pathol. Anatom.*, 70, 72, 1877.

(231) ELLINGER et PRUTZ. Der Einfluss von mekanischen Hindernissen im Dünndarm auf die Indikanausscheidung beim Hunde. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 38, 399, 1903.

ERNST (232) étudie méthodiquement les différentes régions du tube digestif chez un chien qui avait jeûné pendant plusieurs jours et auquel on avait administré un copieux repas de viande. L'animal fut sacrifié quatre heures après le repas et on examina séparément chaque portion du tube digestif.

Voici résumé en un tableau le résultat de ses recherches :

	Estomac.	Jéjunum.	Iléon.	Gros intestin.
Peptones	Abondant.	0	0	0
Tyrosine	0	Abondant.	Faible.	0
Acide acétique.	0	Abondant.	Faible.	0
Oxyacides.	0	Faible.	Faible.	0
Phénol	0	0	0	Beaucoup.
Indol.	0	0	Beaucoup.	Beaucoup.
Scatol	0	0	Beaucoup.	Enorme.

Comme il ressort de ce tableau, nous voyons que chez le chien le processus formateur d'indol est nul dans la partie antérieure de l'intestin grêle et augmente peu à peu lorsqu'on se rapproche de sa partie postérieure. Sa formation n'est véritablement intense que dans le gros intestin, puis elle diminue vers les parties les plus postérieures de celui-ci, l'eau étant en grande partie résorbée, et les débris stercoraires devenant durs.

TAPPEINER (233) a déterminé le lieu de formation de l'indol dans le tube digestif des herbivores : il trouve qu'il se forme dans l'intestin grêle, le cæcum et le côlon, c'est-à-dire dans la presque totalité de l'intestin.

Les faits cliniques ont confirmé de tous points les résultats expérimentaux dont il vient d'être parlé.

Nous empruntons à NOTHNAGEL (234) les observations suivantes :

Dans la constipation habituelle, même quand elle est intense, on n'observe pas d'augmentation d'indican. (JAFFÉ, VRIES, ORTWEILER, NOTHNAGEL, BRIEGER.)

(232) ERNST. Ueber die Fäulniss der Galle und deren Einfluss auf die Darmfäulniss. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 16, 203, 1891.

(233) TAPPEINER. Ueber die Bildungstättten des Phenols, Indols und Skatols im Darmkanale der Pflanzenfresser. *Berichte*, 14, 2382, 1882.

(234) NOTHNAGEL. *Handbuch*, 17, 673.

Pour qu'il y ait indicanurie, il faut qu'il se produise une stagnation dans l'intestin grêle. (CARTER, JAFFÉ, HENNIGE, SENATOR, LEUBE, VON JAKSCH.)

C'est généralement après vingt-quatre heures de stase que l'indican apparaît avec son taux maximum.

Toute stase du gros intestin ne produit aucune indicanurie.

Dans la *péritonite diffuse*, il se produit une exagération considérable dans l'excrétion d'indican, parce qu'il y a stagnation des résidus alimentaires dans tout le conduit intestinal, par suite de la parésie de la musculuse intestinale sous-jacente à la séreuse enflammée.

Enfin, dans certaines maladies de l'intestin grêle accompagnées de diarrhée, on observe aussi une forte indicanurie. C'est le cas de la *fièvre typhoïde*, du *choléra*, de la *tuberculose intestinale*, du *catarrhe* de l'intestin grêle.

Plusieurs causes agissent ici pour arriver à ce résultat : l'intestin se défend mal, les fonctions digestives normales sont altérées, la flore intestinale est largement contaminée par des microbes producteurs d'indol et les stases sont fréquentes : toutes conditions pour que la production d'indol se développe.

Celle-ci se ralentit au contraire dans les dysenteries au cours desquelles le péristaltisme intestinal est exagéré, bien que les putréfactions digestives soient excessives. La lésion de la muqueuse qui s'oppose à la facile résorption des produits formés dans la lumière du canal et la rapide évacuation de ces détritiques sous l'influence des contractions spasmodiques d'une musculuse excitée font qu'il y a très peu d'indol résorbé.

Il est bien établi aujourd'hui que c'est dans le gros intestin que se fabrique la plus grande partie de l'indol, mais nous venons de voir toutefois qu'il peut s'en former dans les parties moyenne et surtout postérieure de l'intestin grêle, toutes les fois qu'il y a stase, c'est-à-dire toutes les fois que les phénomènes digestifs réguliers en se ralentissant font place aux phénomènes putréfactifs anormaux.

C'est ce qu'ont pensé JAFFÉ et après lui ELLINGER.

La putréfaction des substances azotées a lieu surtout dans le gros intestin, cæcum et côlon, par le jeu des microbes, si abondants dans cette partie du tube digestif.

Mais à l'état normal, la digestion des albuminoïdes dans l'intestin grêle est tout à fait d'ordre diastasique; il ne s'y surajoute d'élément microbien et conséquemment putréfactif que lorsqu'il y a stagnation des matières pour une raison quelconque : *expérimentale* (interception d'une anse intestinale entre deux ligatures) ou *pathologique* (péritonite diffuse amenant nous l'avons dit une parésie de la musculature).

Qu'une stase dans le gros intestin, que la constipation opiniâtre chez l'homme et le chien n'amènent pas d'hyperindicanurie, il n'y a là rien de bien étonnant. Cette stase s'accompagne toujours dans cette portion de l'intestin d'un dessèchement, d'un durcissement des matières. Or, les putréfactions intestinales exigent de l'eau; de plus, ce n'est pas dans les toutes dernières portions du gros intestin qu'elles sont excessives, et de plus, nous avons vu que l'enduit gluant des matières s'oppose à la résorption des substances qui se trouvent dans leur masse.

Chez les herbivores, la constipation ne se montrant jamais aussi opiniâtre que chez l'homme et le chien, par exemple, les observations de NOTHNAGEL en ce qui concerne la stase du gros intestin ne peuvent s'appliquer ici.

2^e MÉCANISME DE FORMATION DE L'INDOL

L'indol étant un corps azoté, il est élémentaire qu'il ne puisse dériver que du dédoublement de substances elles-mêmes azotées, c'est-à-dire de matériaux quaternaires albuminoïdes.

Mais toutes ces dernières, indistinctement, ne sauraient convenir à la formation de l'indol : il faut faire un choix, et c'est ce point qui maintenant va nous occuper.

Nous étudierons ensuite quels sont les agents du dédoublement de ces substances albuminoïdes, dont l'attaque est susceptible de mettre de l'indol en liberté.

Sans faire entre eux dès maintenant les distinctions nécessaires, disons que ces agents sont les microbes qui peuplent les divers compartiments de la cavité digestive.

a) *L'indol se forme aux dépens des matières alimentaires albuminoïdes.*

Nous examinerons d'abord la question chez l'homme et les carnivores.

Depuis longtemps on sait que l'alimentation avec les matières azotées protéiques favorisent remarquablement les putréfactions intestinales et amène dans l'urine le passage d'une proportion parfois considérable de phénol et d'indoxyle sous la forme d'éthers sulfuriques.

SALKOWSKI, JAFFÉ ont montré, à la suite de leurs recherches expérimentales que les putréfactions intestinales varient parallèlement avec la quantité de matériaux albuminoïdes absorbés.

ORTWEILER (235) montre que, sous l'influence de l'alimentation carnée, les substances aromatiques de l'urine, et plus spécialement le phénol et l'indol, apparaissent en abondance.

MESTER (236) a étudié l'influence de la viande et a comparé l'effet de la viande fraîche et de la viande faisandée. Il a trouvé que la proportion d'éthers sulfuriques augmentait de 1 à 12, suivant l'état de corruption.

PEUROSCH (237) a démontré que l'indol se forme aux dépens de l'alimentation carnée.

Sans insister davantage sur ce fait aujourd'hui bien connu que c'est aux substances protéiques que l'on doit l'apparition de l'indol dans l'intestin, de l'indoxyle dans l'urine, il est nécessaire de se demander si l'on ne doit pas faire un choix entre elles.

C'est ce dont l'observation et l'expérimentation démontrent l'utilité.

Il ne suffit pas qu'un aliment soit azoté et protéique pour être susceptible de fournir de l'azoté. Il lui faut avant tout renfermer dans sa molécule le groupement générateur de l'indol qu'on admet être le *tryptophane*, comme nous le verrons plus loin.

UNDERHILL (238) a relaté une série d'expériences faites sur des

(235) ORTWEILER. Ueber die physiologische und pathologische Bedeutung des Harnindikans. *Mitt. d. med. Klinik. Würzburg*, 2, 153, 1886.

(236) MESTER. Ueber Magensaft und Darmfäulniss. *Zeitschr. für klin. Medic.*, 24, 441, 1894.

(237) PEUROSCH. *Beiträge zur Lehre über die Entstehung des Indikans im Thierkörper*. Inaugur. Dissert., Königsberg, 1877 (22 pages).

(238) UNDERHILL. On the origine and precursors of urinary indican. *Americ. Journ. of Physiol.*, 12, 176, 1904.

chiens nourris d'abord avec de la viande maigre, puis dans la suite avec de la gélatine. Dans ces deux séries d'expériences, les animaux recevaient le même quantum d'azote.

Cet auteur a montré qu'à la suite d'absorption de gélatine, la quantité d'indican excrétée a considérablement diminué.

ROBIN avait déjà constaté un fait analogue avant UNDERHILL.

Ces résultats n'ont rien qui doive surprendre, car dans les produits fournis par l'hydrolyse, la gélatine donne, d'après FISCHER, LEVENE et ADERS (239):

Glycocolle	16,3 "
Alanine.	0,8
Leucine	2
Acide aspartique	0,5
Acide glutanique	0,9
Tryptophane	0,0
Acide pyrrolidine-carbonique	5,2
Phénylalanine.	0,4

Par dédoublement de la gélatine au moyen des acides et des alcalis, ou lors de la putréfaction, il ne se produit ni phénol, ni indol, ni scatol, mais on obtient de la phényléthylamine.

SELITRENNY (240), en attaquant la gélatine par le *bacillus liquefaciens magnus*, a obtenu du méthylmercaptop, des acides gras volatils, du glycocolle, de la leucine, de l'acide phénylpropionique, mais pas d'indol.

Par oxydation au moyen du permanganate de potassium, MALY obtint également de l'acide benzoïque.

La gélatine donnerait, suivant LOMMEL (241) et STRADOWSKY (242), surtout de l'acide oxalique.

La comparaison entre la viande et la gélatine est un exemple bien choisi pour montrer l'importance de la *qualité* de la substance

(239) FISCHER, LEVENE et ADERS. Ueber die Hydrolyse des Leims. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **35**, 70, 1902.

(240) SELITRENNY. Ueber die Zersetzung des Leims durch anaerobe Spaltpilze. *Monatsh. für Chem.*, **10**, 908, 1889.

(241) LOMMEL. Ueber die Herkunft der Oxalsäure im Harn. *Deutsch. Arch. für klin. Medic.*, **63**, 399, 1899.

(242) STRADOWSKY. Die Bedingung der Oxalsäurebildung im menschlichen Organismus. *Arch. für pathol. Anatom.*, **163**, 404, 1901.

protéique. Il suffit que celle-ci, sous l'influence de dédoublements chimiques et microbiens *in vitro*, donne de l'indol pour qu'elle soit apte à en mettre en liberté dans l'intestin.

Ceci admis, on comprend aisément que les substances protéiques indologènes peuvent varier profondément par la nature de leurs autres groupements.

b) *Quel est le groupement azoté générateur d'indol le plus simple ?*

La formule chimique de l'indol nous oblige à rechercher dans les groupements cycliques compliqués des matières protéiques celui qui serait susceptible, par un dédoublement plus accentué, de mettre en liberté l'indol.

Pour NENCKI (243, 244), la plupart des matières albuminoïdes renfermeraient, outre leurs constituants acycliques, trois groupements aromatiques qui seraient :

1^o Celui de la phénylalanine ;

2^o Celui de la tyrosine ;

3^o Celui du tryptophane, qu'il appelait le protéïne-chromogène.

Dans l'idée de NENCKI, le tryptophane devait être le plus important des trois. NENCKI l'avait entrevu dans les produits de dédoublement des albuminoïdes, au cours de la putréfaction.

HOPKINS et COLE (245, 246, 247) ont isolé le tryptophane et en ont établi la formule de constitution. Ils l'ont obtenu pur et cristallisé en attaquant la caséine par le suc pancréatique. Ce corps ne serait autre qu'un acide mono-aminé : l'acide scatolaminoacétique ou scatolglycocolle. C'est dans ce tryptophane ou protéïne-chromogène que NENCKI entrevoyait, en 1889, le groupement originel des chromogènes de l'organisme.

(243) NENCKI. Untersuchungen über die Zersetzung des Eiweisses durch anaerobe Spaltpilze. *Monatsh. für Chem.*, **10**, 506, 1889.

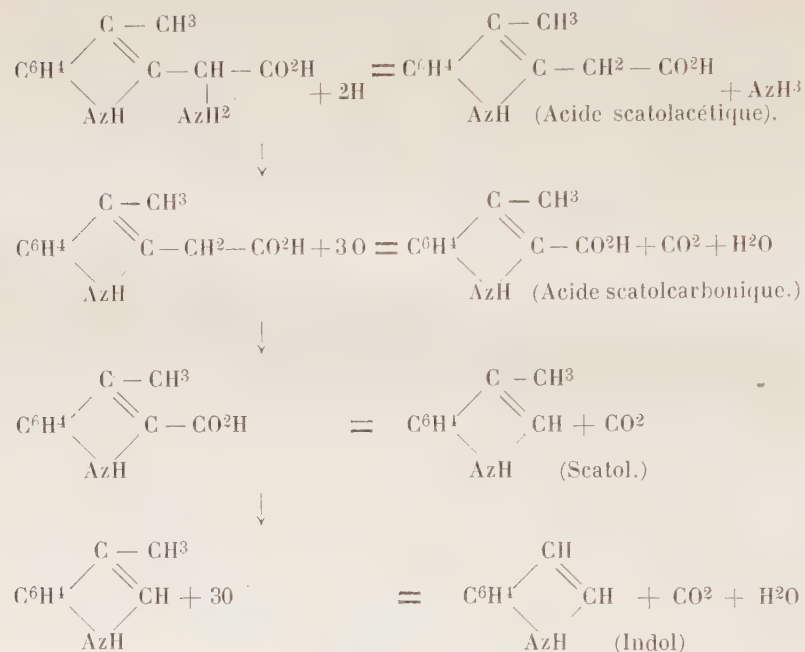
(244) NENCKI. Zur Kenntniss der pankreatischen Verdauungsprodukte des Eiweisses. *Berichte*, **28**, 560, 1895.

(245) HOPKINS et COLE. A contribution to the chemistry of proteïds. *Journ. of Physiol.*, **27**, 418, 1901.

(246) HOPKINS et COLE. A contribution to the chemistry of proteïdes. (II, The constitution of tryptophane and the action of Bacteria upon it.) *Journ. of Physiol.*, **29**, 451, 1903.

(247) COLE. On certain colourreactions of proteïd due to tryptophane. *Journ. of Physiol.*, **30**, 311, 1903.

HOPKINS et COLE ont montré que le tryptophane donnait, par une série de réactions, de l'acide scatolacétique, de l'acide scatolcarbonique, du scatol et de l'indol. La présence de tous ces corps a d'ailleurs été constatée dans les produits de putréfaction des matières albuminoïdes et leur filiation chimique est des plus simples.



L'action des bactéries sur le tryptophane a été étudiée également par HOPKINS et COLE.

Ils incorporent le tryptophane, corps cristallisé, à de la gélatine — laquelle ne peut donner d'indol — et font agir sur le mélange les bactéries ordinaires de la putréfaction : on obtient de l'indol, du scatol, de l'acide scatolcarbonique, tandis que le *bacillus coli* donnerait, par cultures anaérobies, seulement de l'acide scatolacétique.

Si la putréfaction est bien conduite, le rendement en scatol peut atteindre plus de 63 %.

La formule d'HOPKINS et COLE avait d'abord été critiquée par

ELLINGER (248, 249, 250, 251), qui se basait sur ce que l'ingestion de tryptophane chez l'homme et les animaux ne produit pas d'augmentation de l'indoxyle urinaire, mais plutôt celle d'acide kynurique.

Mais, à nos yeux, ces expériences d'ELLINGER n'infirmant rien l'hypothèse d'HOPKINS et COLE, et en voici la raison : il ne faut pas, en effet, oublier que le tryptophane n'étant pas, comme l'indol, un produit ultime de la décomposition des matières albuminoïdes, il n'est pas indifférent qu'il soit administré par la bouche ou porté dans le gros intestin à l'aide d'une laparotomie.

Dans le premier cas, il sera absorbé dans l'estomac ou le duodénum avant d'être décomposé; dans le second, il sera soumis à des processus putréfactifs qui en amèneront la dislocation pour donner indol et scatol.

C'est pourquoi il apparaissait des plus intéressants de tenter cette expérience, qui consistait à porter le tryptophane directement dans le gros intestin. ELLINGER l'ayant réalisée et constaté consécutivement une augmentation de l'indoxyle urinaire, revint sur ses premières affirmations.

Quant à la phénylalanine et à la tyrosine, on ne saurait les incriminer dans la formation de l'indol, ainsi qu'il résulte des expériences de LANGSTEIN et FALTA (253) puis CROIDIEU (254).

(248) ELLINGER et GENTZEN. Tryptophan, eine Vorstufe des Indols bei der Eiweissfäulnis; Vorläufige Mitteilung. *Beiträge z. chem. Physiol.*, 4, 171, 1903.

(249) ELLINGER. Die Entstehung der Kynurensäure. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 43, 323, 1904.

(250) ELLINGER. Ueber die Konstitution der Indolgruppe im Eiweiss (Synthese der sogenannte Skatolkarbonsäure) und die Quelle der Kynurensäure. *Berichte*, 37, 1801, 1904.

(251) ELLINGER. Ueber die Konstitution der Indolgruppe im Eiweiss. (II, Mitteilung.) *Berichte*, 38, 2824, 1905.

(252) NEUBERG. Zur Kenntniss des Tryptophans. *Charité Annalen*, 30^e année, 424, 1906.

(253) LANGSTEIN et FALTA. Phenylalanin. als Stamm der Homogentisinsäure. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 37, 254, 1903.

(254) CROIDIEU. *Contribution à l'étude de l'indol et de l'indoxyle*. Thèse médec., Lyon 1905, 60 pages.

Le tryptophane donne une belle coloration violette avec le diméthylaminobenzaldéhyde.

C'est sur cette réaction qu'on se base pour mettre en évidence, dans une molécule protéique, la présence de ce groupement et conséquemment celle de l'indol. C'est ainsi que la caséine (255), le blanc d'œuf, l'albumine du sang donnent une coloration rouge ou rouge violacé avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde. La gélatine ne donne rien.

Le réactif d'ADAMKIEWICZ, à l'acide glyoxylique, donne des résultats parallèles à ceux que fournit la paradiméthylaminobenzaldéhyde.

Les *herbivores*, bien que n'absorbant pas de viande, sont cependant de gros producteurs d'indol. C'est qu'ils ingèrent une grande quantité de matières albuminoïdes végétales, capables elles aussi de se dédoubler putréfactivement dans les vastes réservoirs digestifs de ces animaux, pour fournir de l'indol.

c) *Rôle des microbes* : La seule ingestion de matières albuminoïdes renfermant le groupement indologène ne suffirait pas à faire passer des dérivés indoxyliques dans l'urine si ces substances ne devaient pas être la proie des agents de la putréfaction dans la lumière du tube digestif.

Une digestion amicrobienne est incapable de fournir de l'indol.

L'indol ne dérive donc uniquement dans l'intestin que d'un processus microbien : pas de microbes, pas d'indol.

Certes, il est impossible, nous le verrons tout à l'heure, de débarrasser un intestin antérieurementensemencé, de tous ses germes et, par conséquent, on ne peut réaliser la première partie de l'aphorisme ci-dessus : « pas de microbes ».

Mais, cependant, il est des circonstances spéciales où l'on a pu avoir un intestin aseptisé et vérifier que si, dans ces conditions il ne se fait pas d'indol, il ne passe pas d'indican dans les urines.

SENATOR (256), le premier, a montré que l'indoxyle conjugué fait

(255) ERVIN RODDE. Die Farbenreactionen der Eiweisskörper mit. p. dimethylaminobenzaldehyd und anderen aromatischen Aldehyden, *Zeitschr. für physiol. chem.*, **44**, 161, 1903.

(256) SENATOR. Ueber das Vorkommen von Produkten der Darmfäulniss bei Neugeborenen. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **4**, 1, 1880.

constamment défaut dans l'urine des nouveau-nés, alors que l'intestin est encore aseptique.

THIERFELDER et NUTTAL (257) ont démontré plus tard que des cobayes extraits aseptiquement de l'utérus de la mère par l'opération césarienne, puis placés dans des conditions aseptiques et recevant des aliments stérilisés, ne renfermaient, dans leur tube digestif ni microbes, ni produits aromatiques, et également pas d'indol.

On sait de plus, ainsi que SENATOR l'avait déjà vu, que chez le nouveau-né, qu'il s'agisse de l'homme ou des animaux, il n'y a pas d'indol dans le méconium.

Le rôle des putréfactions intestinales a été depuis longtemps mis en évidence pour expliquer la formation parfois abondante des phénols et de l'indol dans le tube digestif.

HEFFNER et KUHNE prouvent que l'indol ne se forme dans le corps que sous l'influence des microbes, et qu'on doit le regarder comme résultant de la putréfaction microbienne des *corps protéiques*.

BÄUMANN et BRIEGER (65) confirment ces assertions. L'indol ne se forme dans l'intestin que sous l'influence des microbes de la putréfaction. Il apparaît avant le phénol et déjà dans la partie postérieure de l'intestin grêle, alors que le phénol se forme uniquement dans le gros intestin. Le phénol, en effet, est un corps moins complexe que l'indol, et doit provenir d'une désagrégation plus avancée de la molécule protéique.

Mais toutefois, c'est surtout dans le gros intestin, c'est-à-dire le compartiment où les actes digestifs sont les plus réduits et les phénomènes putréfactifs les plus développés, que se forme la plus grande partie de l'indol.

Aussi, n'est-il pas surprenant que celui-ci sera fabriqué en abondance, toutes les fois que le développement microbien y sera particulièrement intense ; et il le sera lorsque, comme cela se voit chez les herbivores, les réservoirs intestinaux seront vastes et très propres aux putréfactions.

(257) THIERFELDER et NUTTAL. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 21, 109, 1896 ; 22, 62, 1896 ; 23, 231, 1897.

Beaucoup d'auteurs avaient d'ailleurs été frappés de ce fait que ce sont les animaux qui possèdent de vastes réservoirs intestinaux, comme les herbivores (vache, cheval), qui exercent par leurs urines de grandes quantités de dérivés indoxyliques. Aussi n'ont-ils pas hésité à établir entre la dimension de ces réservoirs et la proportion des conjugués urinaires indoxyliques une véritable relation de cause à effet.

Cette relation n'a rien d'absolu en théorie, et n'est pas nécessairement liée aux proportions souvent grandes des compartiments digestifs en question, mais il faut toutefois reconnaître que, pratiquement, elle est au fond très juste.

Le vaste cæcum et le non moins vaste côlon du cheval se prêtent admirablement au développement de putréfactions souvent intenses.

Ces viscères sont largementensemencés et on devine aisément qu'il est quasi impossible d'en modifier la flore.

Tous les microbes ne sont pas susceptibles de fournir de l'indol, et de même qu'il y a des différences au point de vue de l'aptitude à produire ce composé, entre les substances protéiques alimentaires, de même en existe-t-il entre les microbes intestinaux en ce qui concerne la faculté qu'ils ont de fabriquer de l'indol aux dépens d'une substance protéique contenant cependant un groupement indologène.

STEENSMA (257) signale comme microbes formateurs d'indol, actuellement connus, le bacillus coli, le spirochète de METCHNIKOFF, le bacillus denitrificans agilis, le bacillus cavidia, le microbe du choléra des poules, celui de la diphtérie du pigeon, le proteus vulgaris ; le bacille d'EBERTH ne fournirait pas d'indol.

STEENSMA distille la culture dans un courant de vapeur d'eau et recherche l'indol dans les eaux de condensation, à l'aide de la paradiméthylaminobenzaldéhyde ou de l'azotite de sodium.

Le rôle des microbes dans la genèse intestinale de l'indol ne se déduit pas seulement des faits que nous venons de signaler, mais il est également et clairement mis en évidence par toutes les ten-

(258) STEENSMA. Ueber den Nachweiss von Indol und die Bildung von Indol vortäuschenden Stoffen in Bakterienkulturen. *Centralbl. für Bakteriologie*, 41, mai 1906.

tatives qui ont été faites pour modifier l'intensité des putréfactions intestinales. Toutes les fois que l'on réduit celles-ci, on réduit également, si même on ne supprime pas, l'excrétion urinaire d'indoxyle.

Nous avons en passant tout à l'heure montré l'impossibilité qu'il y a d'aseptiser un intestin antérieurement infecté. Aussi l'expression d'antisepsie intestinale, souvent employée en médecine dans ces vingt dernières années, n'a-t-elle qu'une signification des plus relatives, une valeur des plus minimales.

L'antisepsie intestinale ne nous paraît pas possible au moyen des composés chimiques.

Comme le fait remarquer si judicieusement METCHNIKOFF (259), ainsi que nombre d'auteurs avec lui, l'action des antiseptiques au point de vue de la désinfection du tube intestinal est très infidèle. Depuis l'établissement de la théorie des auto-intoxications d'origine intestinale, BOUCHARD a cherché à guérir les maladies qui dérivent de ces dernières par la désinfection du tube digestif au moyen du β naphtol. Mais il est prouvé que cet antiseptique, comme tant d'autres, n'attaque pas suffisamment les microbes de l'intestin et peut même nuire à l'organisme de l'homme.

Dans un travail très consciencieux, STERN (260) a démontré que les antiseptiques, comme le calomel, le salol, le β naphtol, la naphthaline, le camphre, administrés à des doses compatibles avec la santé de l'homme, sont incapables de désinfecter tant soit peu le tube digestif.

STRASSBURGER (261) s'exprime d'une façon analogue : « L'essai de détruire les bactéries intestinales avec des substances chimiques n'a pas beaucoup de chances pour réussir. On ne peut pas nier que, dans certaines circonstances, il soit possible de limiter jusqu'à un certain point le développement des bactéries, surtout dans l'intestin grêle. Mais cet effet est faible et peut être suivi du

(259) METCHNIKOFF. *Etudes sur la nature humaine. Essais de philosophie optimiste*. 1^{re} édition. Masson, Paris, 1903.

(260) STERN. Ueber Desinfection des Darmkanales. *Zeitschr. für Hygiene*, 12, 88, 1892.

(261) STRASSBURGER. Ueber Bakterienmenge im Darm bei Anwendung antiseptischer Mittel. *Zeitschr. für klin. Medic.*, 48, 491, 1903.

phénomène opposé, lorsque les moyens de défense de l'intestin sont déprimés et lorsque cet organe éprouve plus de dommages que les bactéries. »

STRASSBURGER n'est pas non plus grand partisan des purgatifs. La diminution des éthers sulfoconjugués dans l'urine, qui suit les purgations, pourrait s'expliquer, non par un amoindrissement des putréfactions intestinales, mais plutôt par une diminution de la résorption des produits de la vie bactérienne.

Cette hypothèse s'appuie sur le fait que, chez une chienne de STRASSBURGER, munie de fistule de l'intestin grêle, la diarrhée provoquée par le calomel a amené une augmentation incontestable de la quantité totale des bactéries intestinales.

STRASSBURGER espère qu'on obtiendrait de meilleurs résultats en aidant l'intestin dans ses fonctions naturelles. Si l'on réussit à amener l'intestin à mieux utiliser la nourriture, il en restera d'autant moins pour les microbes.

Le même résultat peut être obtenu par la diminution de la quantité des aliments ingérés. C'est à cette cause qu'il faut attribuer en partie l'effet bienfaisant du jeûne dans les troubles intestinaux aigus.

La conclusion générale des nombreuses recherches faites depuis plus de dix ans, sur l'antisepsie intestinale, est plutôt décourageante. Il est incontestable que l'on ne peut pas beaucoup compter sur ce moyen. Mais, néanmoins, on doit considérer cette question comme loin d'être définitivement réglée, et peut-être le résultat à rechercher est-il sous la dépendance d'un antiseptique convenable.

C'est ainsi que COHENDY, dans le laboratoire de METCHNIKOFF, a fait des recherches sur l'action du thymol sur les microbes intestinaux et a vu que ce phénol réduisait le nombre des microbes au 1/13.

Ces faits prouvent seulement que l'antisepsie intestinale est possible jusqu'à un certain point. Mais, pour l'obtenir, il faut parfois recourir à des doses tellement fortes, que leur emploi ne peut être conseillé que dans des conditions particulières et à des intervalles de temps espacés.

On peut se servir plus fréquemment de certains purgatifs qui, loin de détruire les microbes intestinaux, *les éliminent par voie mécanique.*

On a émis maintes fois la supposition que le calomel, si souvent

employé en thérapeutique, agit comme un véritable antiseptique et diminue, en vertu de ce pouvoir, la richesse de la flore intestinale; mais il est plus probable que ce résultat est dû à son action purgative. Il a été établi que ce sel mercuriel, de même que d'autres purgatifs, amène une diminution notable des putréfactions intestinales, ce qui se manifeste par l'abaissement des éthers sulfoconjugués de l'urine.

BAUMANN (262), WASSILIEFF (263) ont vu disparaître les éthers sulfoconjugués de l'urine d'un chien soumis au jeûne et qui recevait du calomel.

Si, jusqu'à un certain point, l'asepsie très relative de l'intestin peut être obtenue, soit avec le thymol (COHENDY), soit avec le calomel et en laissant de côté le mécanisme d'action de l'un ou l'autre de ces corps, il faut bien se dire qu'il s'agit ici de l'homme ou du chien, animaux dont l'intestin est relativement court. Mais il serait vraiment illusoire de chercher à réaliser par la voie des antiseptiques une antiseptie, même des plus relatives, chez les herbivores dont l'intestin est long et pourvu de compartiments spacieux, toutes conditions qui s'opposent à une action vraiment efficace de l'antiseptique; il faudrait forcer les doses et on arriverait à empoisonner l'animal avant même d'avoir influé sur sa flore intestinale.

Aussi, l'antiseptie intestinale, dans le sens où l'on doit la comprendre, c'est-à-dire d'amoindrissement des putréfactions intestinales, doit-elle être recherchée, non à l'aide des antiseptiques chimiques, mais bien plutôt en modifiant le régime alimentaire, en supprimant tout d'abord chez l'homme et le chien, que nous étudierons seuls ici à ce point de vue, l'alimentation carnée.

Des faits nombreux le montrent péremptoirement.

STRASSER (264) a observé que le lactose diminue de moitié la

(262) BAUMANN. Die aromatischen Verbindungen im Harn und die Darmfäulniss. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 10, 122, 1887.

(263) WASSILIEFF. Ueber die Wirkung des Calomels auf die Gährungsprozesse und das Leben von Mikroorganismen. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 6, 112, 1882.

(264) STRASSER. Ueber die Phenolausscheidung bei Krankheiten. *Zeitschr. für klin. Medic.*, 24, 543, 1894.

quantité des sulfo-éthers dans l'urine ; le lait également diminue considérablement les éthers sulfuriques et les putréfactions intestinales, ce qui explique les bons effets de la diète lactée dans les maladies du tube digestif.

POEHL (265) le premier a montré l'action antiseptique du lait en dosant les éthers sulfuriques dans l'urine et en observant une diminution notable de ceux-ci.

BIERNACKI (266) arrive aux mêmes conclusions.

HIRSCHLER (267) attribue au lactose l'action antiputride du lait ; il aurait pour effet de soustraire la caséine aux fermentations intestinales.

WINTERNITZ (268), dans un travail fort intéressant, a étudié l'effet de l'alimentation carnée et du régime lacté et a comparé les quantités d'acide sulfurique conjugué excrétées dans l'urine. Il trouve quatre fois plus de sulfo-éthers avec la viande qu'avec le lait et dans les excréments au cours du régime lacté, il lui est impossible de déceler soit le phénol, soit l'indol ou le scatol.

Pour expliquer cet effet salulaire du lait sur les putréfactions intestinales, WINTERNITZ émet deux hypothèses :

1° Ou bien les bactéries putréfactives concentrent leur action sur le seul lactose, la caséine est alors préservée (c'est là le point de vue de HIRSCHLER) ;

2° Ou bien ce sont les produits de la fermentation du lactose qui paralysent les microorganismes dont le rôle serait d'agir sur la caséine.

La première hypothèse, qui est aussi celle de HIRSCHLER, ne

(265) POEHL. Bestimmung der Darmfäulniss durch Untersuchung des Harns. *Jahresb. für Thierchem.*, **17**, 277, 1887, et *St-Petersburg Medic. Wochenschr.*, n° 50, 1887.

(266) BIERNACKI. Ueber die Darmfäulniss bei Nierenentzündung und Ikterus, nebst Bemerkungen über die normale Darmfäulniss. *Deutsch. Arch. für klin. Medic.*, **49**, 87, 1892.

(267) HIRSCHLER. Ueber den Einfluss der Kohlenhydrate und einige anderer Körper der Fettsäurereihe auf die Eiweissfäulniss. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **10**, 306, 1886.

(268) WINTERNITZ. Ueber das Verhalten der Milch und ihrer wichtigsten Bestandtheile bei der Fäulniss. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **16**, 460, 1892.

résiste pas devant les faits apportés par BIENSTOCK (269), qu'il existe des microbes spéciaux décomposant la caséine et qui ne sont nullement influencés par le lactose.

WINTERNITZ démontre que l'influence heureuse du lait sur la diminution des putréfactions intestinales n'est due ni aux matières grasses, ni à la caséine ; car si on prive le lait de son lactose, la caséine se putréfie avec la même rapidité que les autres substances protéiques.

Le lactose joue donc un rôle de premier ordre, mais cette action *antifermentescible* du lait n'est pas due au lactose lui-même, ainsi que l'a démontré BLUMENTHAL, mais bien aux acides lactique et succinique qui en dérivent et qui préservent hautement la caséine de la putréfaction.

Cette décomposition du lactose se produit dans l'intestin grêle, sous l'influence de bacilles *aérobies*, le bacillus lactis aérogène principalement.

Ce sont donc les acides lactiques qui paralysent les bacilles *anaérobies* protéolytiques du gros intestin et empêchent de la sorte la putréfaction de la caséine, ou plutôt des peptones qui en dérivent.

L'influence de l'acide lactique sur la diminution des fermentations intestinales ressort nettement de ce qui vient d'être dit ; mais elle est encore mieux marquée dans les heureux effets de l'emploi alimentaire des laits ou des préparations lactées aigres : kéfir, koumys, yoghourt, leben.

SCHMITZ (270) a étudié l'effet du fromage frais sur l'excrétion des sulfoconjugués, et il a conclu que le fromage et le caillé exercent un *pouvoir antiputride bien plus énergique que le lait lui-même*.

Ces faits ont été en outre confirmés par : GUSSAROW (271), NASSAROW (272).

HIRSCHLER (267) constate que l'alimentation farineuse fait égale-

(269) BIENSTOCK. Ueber die Bacterien der Fäces. *Zeitschr. für klin. Medic.*, 8, 1, 1884.

(270) SCHMITZ. Zur Kenntniss der Darmfäulniss. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 17, 401, 1893.

(271) GUSSAROW. Inaugur. Dissert., Saint-Petersbourg, 1889.

(272) NASSAROW. Inaugur. Dissert., Saint-Petersbourg, 1891.

ment baisser considérablement le taux des éthers sulfuriques de l'urine.

HOPPE-SEYLER (273) signale l'influence très marquée de la diète végétarienne sur la diminution des éthers sulfoconjugués.

A l'appui de tous ces faits, nous venons rappeler les résultats que nous avons été à même de constater au laboratoire, M. PORCHER et moi, avec une très grande constance, depuis sept ans bientôt que nous nous occupons de la question des indols.

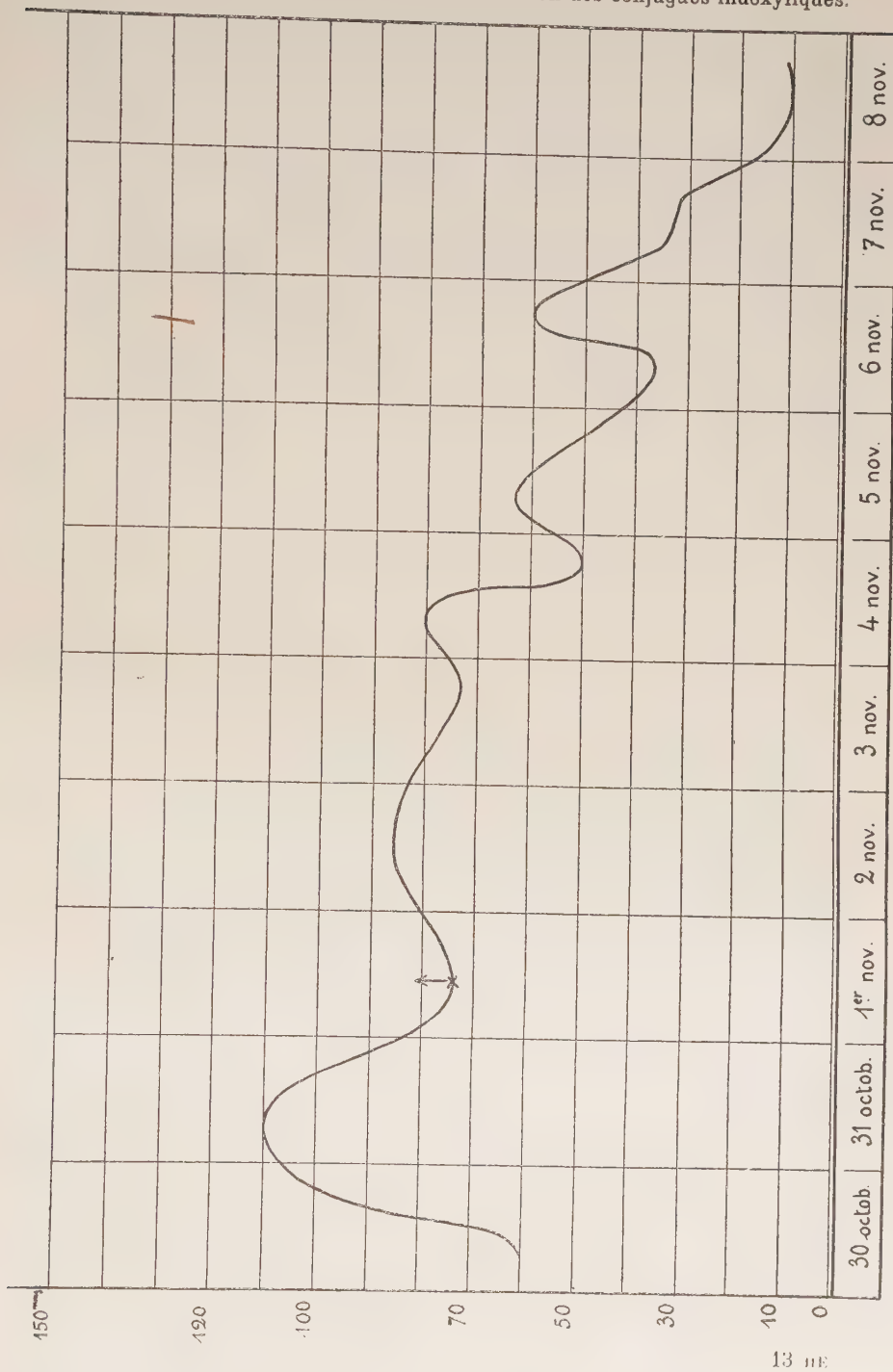
Toutes les fois que nous soumettons un chien au régime lacté ou à celui de la soupe au pain, nous voyons son indican urinaire diminuer, jusqu'à disparaître même. Les excréments ne contiennent pas d'indol.

Toute alimentation à prédominance hydrocarbonée nous semble susceptible de fournir les mêmes résultats.

Voici une courbe et un tableau qui résument les examens de l'indoxyle urinaire chez un chien soumis au régime lacté, après une purgation préalable.

(273) HOPPE-SEYLER. Ueber die Ausscheidung der Aetherschwefelsäuren im Urin bei Krankheiten. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 12, 16, 1888.

Effets de l'alimentation lactée sur l'excrétion des conjugués indoxyliques.



	30 oct.	31 oct.	1 nov.	2 nov.	3 novembre		4 novembre		5 novembre		6 novembre		7 novembre		8 novembre
					M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	S
Régime	Mixte	Viande	Viande	Purgation	Lait		Lait		Lait		Lait		Petit-lait		Petit-lait
Densités	»	»	»	1,033	1,040	1,041	1,040	1,031	1,027	»	1,021	1,019	1,021	1,020	1,017
Quantités d'urines en cc.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	150	500	300	400	150
Essais qualitatifs (à l'eau oxygénée, à l'Isatine)	Net	Riche	Riche	Riche	Net	Moins net	Faible		Faible		Nul		Nul		Nul
	Rouge vif	Rouge vif	Rouge vif	Rouge vif	Rouge	Rouge	Rouge		Rouge moins fort		Rose		Peu rose		Insensible
Indigo au litre en milligrammes	60,5	109,0	72,6	84,7	81,0	72,6	76,0	48,4	63,5	»	36,3	60,5	33,0	31,0	12,1

De l'origine interne de l'indol.

Puisque l'indol dérive si facilement du dédoublement de certaines matières albuminoïdes sous l'influence de l'attaque que subissent ces dernières par des microbes déterminés, il est naturel de penser, connaissant le parallélisme qu'on a souvent établi entre la vie cellulaire et la vie microbienne, que l'indol peut provenir aussi de la désintégration des albuminoïdes des cellules vivantes aux cours du fonctionnement normal de celles-ci.

Dans cette hypothèse l'indol se formerait donc dans l'intimité des tissus et aurait ainsi une genèse endocellulaire.

Pour que cette opinion sorte du domaine spéculatif, il faudrait qu'elle s'appuyât sur des expériences faciles à interpréter.

Trois ordres de faits ont servi de base aux partisans de l'origine interne de l'indol. Nous verrons combien en les examinant les uns après les autres ils sont fragiles et discutables.

DE L'INDOL DANS LE JEÛNE

Beaucoup d'auteurs, pour soutenir l'origine endocellulaire de l'indol se sont appuyés sur ce que pendant l'inanition on trouve toujours de l'indican dans l'urine, lequel dérive, pour eux, de l'indol formé au cours de la vie cellulaire.

Avant de voir quelle valeur il convient d'accorder à cet argument, examinons rapidement les recherches qui ont été faites au cours du jeûne, en ce qui concerne l'indol et l'indican urinaire.

LUCIANI (274), qui a eu la bonne fortune de pouvoir étudier les effets du jeûne chez Succi, a trouvé de petites quantités de phénol et d'indol au trentième jour du jeûne.

MÜLLER (275), qui a observé les urines de Cetti et de Breithaupt, déclare ne pas constater la présence de corps aromatiques dans l'urine pendant la période de jeûne. Ce ne fut qu'après la réalimentation ordinaire qu'on vit réapparaître ces corps dans l'urine.

(274) LUCIANI. *Das Hunger*. Leipzig 1890.

(275) MÜLLER. Ueber Indikanausscheidung durch den Harn bei Inanition. *Mitteil. aus d. Klin. zu Würzburg*, 2, 341, 1886.

TÜZECK, chez une personne souffrant d'une maladie nerveuse et qui était restée vingt-deux jours sans prendre d'aliments n'a observé aucune augmentation urinaire du taux des corps cycliques et notamment de l'indol. L'indoxyle dans l'urine ne commença à apparaître qu'après cinq jours de réalimentation.

Il semblerait qu'en face de ces faits cliniques contradictoires, l'expérimentation dût donner une solution définitive.

Or, il n'en a rien été, comme on peut en juger par ce qui suit :

En 1886, dans le cours de ses recherches sur le jeûne, MÜLLER (275) soumit à l'inanition des chiens et des chats et constata une augmentation nette de l'indoxyle urinaire.

KRAUSS, peu de temps après, soumit deux chiens à l'inanition : chez l'un, l'indoxyle urinaire diminua progressivement et finalement disparut; chez l'autre, il y eut pendant toute la durée du jeûne une excrétion constante, mais très faible d'indoxyle.

BLUMENTHAL (276) fait jeûner des cobayes et observe une augmentation des phénols et de l'indoxyle dans l'urine.

ROSENFELD soumet des lapins à l'inanition pour les forcer, dit-il, à comburer leurs propres tissus et trouve également une augmentation de l'indoxyle urinaire.

L'erreur de tous ces chercheurs fut de croire qu'en soumettant leurs animaux au jeûne ils supprimaient du même coup les fermentations intestinales en soustrayant aux microbes intestinaux toute substance susceptible d'être attaquée par eux.

Or il n'en est rien. Les quantités si minimes d'indol trouvé dans l'intestin et d'indican rencontré dans l'urine doivent être attribuées à la *putréfaction des matières albuminoïdes* des sécrétions intestinales qui persistent pendant très longtemps dans l'état de jeûne et aussi du sang des hémorragies intestinales fréquentes dans l'inanition (METCHNIKOFF) (253).

C'est ainsi que SCHOLZ (277) a trouvé que cette petite quantité d'indoxyle provenait de l'indol produit par l'attaque des sucs

(276) BLUMENTHAL. Ueber die Ausscheidung von Indoxyl als Zeichen einer Stoffwechselstörung. *Jahresb. für Thierchem.*, 1902; *Beitrag. für inner. Medic.*, 2, 267, 1902.

(277) SCHOLZ. Beiträge zur Frage der Entstehung des Indikans im Thierkörper. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 38, 513, 1903.

digestifs par les bactéries de la putréfaction et que ERNST (278) a montré qu'une partie de l'indol se forme sous l'influence de la putréfaction des liquides digestifs, tels que la bile, les sucs intestinaux et pancréatique, le mucus.

ELLINGER (279) a d'ailleurs réfuté les assertions de BLUMENTHAL et ROSENFELD (280) et a montré que les résultats de ces auteurs étaient entachés d'une erreur de technique originelle.

Si les cobayes de BLUMENTHAL, dit-il, avaient de l'indol dans leur intestin, malgré l'état de jeûne, c'est parce qu'ils dévoraient leurs crottes et augmentaient par cela même la putréfaction de leur intestin.

Les expériences d'Ellinger portent sur trois groupes de lapins :

Le premier groupe ne reçoit aucun aliment, mais les animaux peuvent manger leurs crottes ;

Le deuxième groupe ne reçoit non plus aucun aliment, les animaux sont placés dans une cage à double fond dont le grillage permet le passage des crottes ;

Le troisième groupe comprenait trois animaux, dont deux avaient une muselière les empêchant de toucher leurs excréments et le troisième une fistule de l'œsophage.

L'indoxyle urinaire était dosé par la méthode de WANG.

Les animaux des premiers groupes montrent de grandes différences dans l'excrétion de l'indoxyle. Chez ceux du premier, la teneur en indoxyle s'est élevée jusqu'à 14 milligr. par jour, alors que dans le deuxième groupe elle n'a jamais dépassé 6,5 milligrammes.

Chez les animaux du troisième groupe, l'excrétion d'indoxyle varie dans des limites beaucoup plus étroites et tend vers 0.

Si l'opinion de BLUMENTHAL et de ses élèves devait être tenue pour exacte, on aurait dû obtenir des résultats tout à fait opposés.

La question de l'indol dans le jeûne a été reprise récemment

(278) ERNST. Ueber die Fäulniss der Galle und deren Einfluss auf die Darmfäulniss. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **16**, 216, 1891.

(279) ELLINGER. Die Indobildung und Indikanausscheidung beim Hunger in den Kaninchen. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, **39**, 44, 1903.

(280) BLUMENTHAL et ROSENFELD. Ueber die Entstehung des Indikans im thierischen Organismus. *Charité Annalen*, **27**, 1, 1903.

par MM. LABBÉ et VITRY (281, 282, 283) et par nous-même avec M. GAUTIER (284).

Nous ferons à MM. LABBÉ et VITRY un reproche que nous aurions d'ailleurs pu adresser à plusieurs autres expérimentateurs et qui, pour cela, est d'ordre très général.

Dès l'instant où l'on veut faire reposer ses conclusions sur des différences, somme toute très faibles, dont les variations sont déjà du ressort des erreurs d'expériences, il faut avant tout posséder une technique excellente. Or, une pareille technique n'existe pas encore pour le dosage de l'indican, quoi qu'on en ait dit, et l'on juge tout de suite de la valeur que l'on doit accorder à certaines conclusions, lorsque les prémisses d'ordre technique qui servent à les édifier sont elles-mêmes si fragiles.

MM. LABBÉ et VITRY ont fait porter leur examen sur un chien qui, soumis au jeûne, présentait encore la veille de sa mort, le 53^e jour de l'inanition, de l'indoxyle dans ses urines ; ils en concluent qu'il est impossible d'admettre que l'indican constitue un indice urinaire de la putréfaction intestinale.

Évidemment, la putréfaction n'est pas intense dans l'intestin de cet animal profondément inanitié, mais elle n'en existe pas moins, elle s'exerce aux dépens des sucs digestifs eux-mêmes raréfiés des débris épithéliaux de la muqueuse et se trouve favorisée par la stase qui accompagne forcément le repos fonctionnel de l'intestin.

Au surplus, les recherches du genre de celles de MM. LABBÉ et VITRY sont entachées d'une erreur grave.

Il ne faut pas se contenter de voir s'il y a encore de l'indoxyle dans l'urine des animaux inanitiés aux diverses périodes du jeûne, mais il faut aussi rechercher s'il y a corrélativement de l'indol dans l'intestin. Or, pareille recherche n'a pas été effectuée.

L'absence absolue et constamment observée de l'indol dans l'in-

(281) LABBÉ et VITRY. L'indican dans le jeûne. *C. R. Soc. Biol.*, n° 22, 1142, 1907.

(282) LABBÉ et VITRY. L'indican dans quelques états pathologiques. *C. R. Soc. Biol.*, n° 26, 172, 1907.

(283) LABBÉ et VITRY. Le métabolisme de l'indican. *C. R. Soc. Biol.*, n° 28, 316, 1907.

(284) GAUTIER et HERVIEUX. Présence de l'indol dans le gros intestin au cours du jeûne chez le chien. *C. R. Soc. Biol.*, n° 27, 223, 1907.

testin, alors qu'il y aurait également constamment de l'indican dans l'urine, serait peut-être la plus forte présomption qui soit en faveur de l'origine endogène de l'indol.

Avec M. GAUTIER, en opérant sur le chien et sur le lapin, nous avons constamment rencontré de l'indol dans le gros intestin de ces animaux pendant le jeûne prolongé et parfois jusqu'à la mort.

En résumé, si on examine attentivement les faits ou les expériences sur lesquels on a voulu établir l'hypothèse de l'origine intracellulaire de l'indol, on s'aperçoit qu'ils se tournent contre leurs auteurs ou interprétateurs.

Cette hypothèse est cependant admise par BLUMENTHAL dans son livre : « Aus diesen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, dass auch durch toxischen Gewebszerfall ohne bakteriellen Thätigkeit Indoxyl im Organismus entstehen kann. »

Un parallélisme assez vague et souvent fortuit entre l'excrétion de l'indican et celle de l'urée ne suffit pas pour faire dériver l'indol correspondant à cet indican de la désintégration des mêmes matériaux albuminoïdes qui ont fourni l'urée. Ce parallélisme devrait être constant et encore une fois l'indol ne devrait pas se rencontrer à l'état libre dans l'intestin des animaux inanitiés.

GNEZDA (285), en citant un cas de maladie mentale où il a trouvé de grandes quantités d'indoxyle à côté d'une forte augmentation de l'excrétion d'urée, part de là pour considérer l'indoxyle comme provenant des substances albuminoïdes des cellules vivantes, sans intervention des bactéries de la putréfaction ; c'est arranger trop aisément les choses. C'est aussi une grosse conclusion, pour une seule observation, au surplus très critiquable.

SENATOR (286) dit avoir observé une abondante excrétion d'indoxyle urinaire dans les maladies d'inanition (consomption) et affirme que cette excrétion est d'autant plus accusée que l'état anémique est plus prononcé. Dans ces états, ajoute-t-il, on constate toujours une grande destruction des matériaux albuminoïdes des tissus.

(285) J. GNEZDA. Sur une production conjuguée d'indoxyle et d'urée dans l'organisme. *C. R. Acad. Sciences*, 134, 483, 1902.

(286) SENATOR. Ueber Schwarzen Urin und schwarzen Ascites. *Jahresb. für Thierchem.*, 21, 429, 1891.

GNEZDA comme SENATOR et beaucoup d'autres auteurs voient ici les choses telles qu'ils veulent qu'elles soient; ils ne tiennent pas compte de tous les facteurs qui doivent être examinés et négligent de propos délibéré l'état de l'intestin et des putréfactions qui s'y passent.

DE L'INDOL AU COURS DE L'ANTISEPSIE INTESTINALE

Un des principaux arguments des partisans de l'origine cellulaire de l'indol, c'est la persistance de celui-ci après la désinfection du tube digestif par les antiseptiques.

Nous avons vu antérieurement ce qu'il fallait penser d'une telle désinfection. Il n'est pas possible d'aseptiser réellement l'intestin; conséquemment, l'un des facteurs de production de l'indol, c'est-à-dire la flore microbienne, n'en continue pas moins à persister.

La diminution des putréfactions intestinales ne saurait donc suivre l'emploi des antiseptiques chimiques; elle est plutôt le fait de la substitution d'un régime lacté ou très hydrocarboné au régime carné chez l'homme et les carnivores, et, dans ces conditions, quand le régime est établi depuis longtemps, on peut constater parfois chez le chien l'absence complète d'indican dans l'urine, alors que l'excrétion azotée est normale. Le parallélisme dont nous parlions tout à l'heure à propos de l'observation de GNEZDA n'existe donc plus ici.

DE L'INDOL AU COURS DE CERTAINES INTOXICATIONS

Sous l'influence de certaines intoxications, il se produit des manifestations métaboliques, des troubles des échanges nutritifs, au cours desquels il y a lieu de supposer, d'après les partisans de l'origine interne de l'indol, que les molécules protéiques des plasmas cellulaires subissent des dislocations susceptibles de mettre de l'indol en liberté. Mais avant de prêter créance aux expériences qui ont pour but de servir de justification à cette hypothèse, il y a lieu de se demander si les auteurs, hypnotisés par leur idée préconçue, n'ont pas négligé des facteurs importants et dont la considération aurait pu les faire changer d'avis.

C'est ainsi que HARNACK, en décrivant une excrétion considérable d'indican dans un empoisonnement par l'acide oxalique, ne fait pas

suffisamment entrer en ligne de compte les troubles intestinaux concomitants et notamment une diarrhée intense. Or, nous savons que toute diarrhée, qu'elle soit de nature microbienne ou chimique, s'accompagne d'une augmentation notable du taux urinaire de l'indican. Il est vrai que pour obvier à cet inconvénient, HARNACK injecta alors sous la peau de ses animaux de l'oxalate de sodium et obtint des résultats analogues aux précédents. L'oxalate de sodium à faibles doses ne provoquant pas de diarrhée, l'augmentation de l'indoxyle était rattachée par HARNACK aux troubles des échanges dus à l'acide oxalique.

SCHOLZ (277) reprend ces expériences et, comme l'auteur précédent, estime la quantité d'indol formé par celle de l'indican trouvée dans l'urine.

Dans une première série de recherches sur quatre chiens soumis à un même régime (500 gr. pain + 250 gr. viande), il fait prendre 0 gr. 10 d'oxalate de sodium et, contrairement à HARNACK, il montre que l'indoxyle n'a pas subi d'augmentation.

Dans une deuxième série d'expériences sur des cobayes soumis au même régime (400 gr. carottes + 200 gr. pain), il injecte quotidiennement 5 centigrammes d'oxalate de sodium pendant trois jours. Encore dans ce cas, SCHOLZ n'a pas pu déceler d'augmentation de l'indoxyle.

L'intoxication par la phloridzine a été souvent invoquée à l'appui de l'origine cellulaire de l'indol; mais là encore, les faits ne nous semblent pas suffisamment bien interprétés.

Il faudrait d'ailleurs commencer par s'entendre sur l'origine du sucre urinaire faisant suite aux injections de phloridzine. Il est évident que si le sucre provient ici d'une dislocation de l'albumine, il est certain que celle-ci ne sera pas sans amener une élimination simultanée de déchets azotés, à commencer par l'urée, à continuer peut-être par l'indol. Dans ce cas, s'il y a augmentation du taux urinaire de l'indoxyle, nous aurons également une élévation notable de celui de l'urée; les phénols, se comptant aussi parmi les déchets de l'albumine, seront éliminés en plus forte proportion.

Mais la théorie de la glucosurie phloridzique, qui attribue le passage du sucre dans l'urine à une diminution de la perméabilité rénale pour le glucose du sang, nous paraît plus justifiée que la

précédente; elle rassemble plus de bonnes raisons qu'elle. Elle ne devra donc pas être suivie des mêmes conséquences en ce qui concerne l'urée et l'indol.

Quoi qu'il en soit, si ce sont aux faits de répondre, la plus grande contradiction y règne malheureusement.

LEWIN (287), en expérimentant chez le lapin, observa une augmentation constante des phénols et de l'indican (jusqu'à 200 %); chez l'homme, le phénol seul était augmenté. En même temps, l'urine contenait aussi de l'acide glycuronique, dont l'apparition devait être liée à l'augmentation des phénols et de l'indoxyle, « sans doute, parce que l'acide sulfurique ne suffit plus pour fixer la totalité de ces produits aromatiques et que le surplus s'élimine avec l'acide glycuronique, sous forme de dérivés conjugués ».

En nous plaçant comme nous l'avons toujours fait dans nos expériences, c'est-à-dire en utilisant des chiens dont le taux de l'indican urinaire était nul par suite d'une alimentation au pain depuis longtemps soutenue, nous avons constaté nettement que l'urée n'était pas augmentée et que l'indoxyle n'apparaissait pas dans l'urine.

En résumé, aucun fait expérimental incontestable ne vient soutenir l'origine cellulaire de l'indol. Nous le répétons, l'hypothèse était séduisante, mais c'est tout.

Si l'indol devait provenir de la désintégration régulière des protéides cellulaires, l'urine devrait constamment renfermer de l'indoxyle, et cela n'est pas, ainsi que nous l'avons si souvent constaté, M. PORCHER et moi (288).

FORMATION ANORMALE D'INDOL DANS LES SUPPURATIONS

La production d'indol aux dépens de matériaux albuminoïdes étant sous la dépendance effective d'un processus bactérien, on conçoit que ce corps puisse se produire partout où pullulent des germes capables de décomposer les albuminoïdes et de former de

(287) LEWIN. Ueber die Bildung von Phenol und Indoxyl im intermediären Stoffwechsel und deren Beziehung zum Glukuronsäure Ausscheidung. *Beitrag. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1, 472, 1902.

(288) PORCHER et HERVIEUX. La signification de l'indoxyle urinaire. *C. R. Soc. Biol.*, 63, 539, 1907.

l'indol. Ce phénomène peut *a priori* se produire dans des régions autres que l'intestin. Ceci est établi d'une façon évidente par de nombreuses *observations cliniques* où les médecins disent avoir observé une augmentation d'indican urinaire à la suite d'affections putrides, bronchite putride, abcès, collection purulente.

BRIEGER (289) a trouvé que l'indoxyle était excrété en plus grande abondance dans les affections purulentes, par exemple la *bronchite purulente*.

KEILMANN (290) confirme ces faits.

TESTI (291) est moins affirmatif et dit que l'augmentation de l'indoxyle est assez *fréquente* dans les suppurations.

Plus tard, BECKMANN (292), sur vingt-six cas d'affections purulentes, ne trouve d'augmentation réelle que dans six cas seulement.

BLUMENTHAL (293) a observé constamment une augmentation de l'indol dans les collections purulentes, les abcès, les empyèmes. Il est bon de faire remarquer que tous les cas cliniques n'offrent pas les mêmes garanties d'exactitude, au point de vue scientifique; la technique suivie est quelquefois très critiquable et ne permet nullement les conclusions annoncées par l'auteur. Enfin, on n'a en vue que l'indol pouvant être formé au niveau des collections purulentes, alors qu'on ne fait pas attention à l'autre source constante de l'indol, l'intestin.

Il y aurait peut-être lieu d'être aussi circonspect pour les cas de tuberculose intestinale, au cours desquels on aurait constaté parfois une augmentation de l'indican urinaire et cependant ici il est très possible d'admettre que la bacillose dans le cas d'ulcères, par

(289) BRIEGER. Einige Beziehungen der Fäulnisprodukte zu Krankheiten. *Zeitschr. für Klin. Medic.*, 3, 468, 1881.

(290) KEILMANN. Beobachtungen über der diagnostischen Verwerthbarkeit der Indikanurie. *St-Petersb. Medic. Wochenschr.*, 10, n° 25, 1893.

(291) TESTI. Indicanuria nelle suppurazioni. *Policlinico*, n° 4, 1893; *Centralbl. für inner. Medic.*, 16, n° 51, 1893.

(292) BECKMANN. Klinische Untersuchungen über den diagnostischen Werth der vermehrten Indicanausscheidung bei Eiterungen. *St-Petersb. Medic. Wochenschr.*, 11, n° 28, 255, 1894, et 11, n° 29, 263, 1894.

(293) BLUMENTHAL. Inaugur. Dissertat. Medic., Berlin 1899.

exemple, se complique d'infections surajoutées susceptibles, pour leur propre compte, d'augmenter les putréfactions intestinales.

C'est ainsi que BLUMENTHAL signale une forte augmentation de l'indoxyle urinaire dans la phthisie accompagnée de diarrhée, c'est-à-dire lors de tuberculose intestinale.

CATTANEO (294) va même plus loin et assure que cette augmentation est constante, chez les enfants tuberculeux et la propose comme symptôme important devant servir au diagnostic de la tuberculose chez ces derniers.

HOCHSINGER (295, 296) considère cette augmentation chez les enfants tuberculeux comme constante et ayant une réelle valeur diagnostique.

Plus récemment, MOMIDŁOWSKI (297), STEFFEN (298) ont contrôlé les faits avancés par HOCHSINGER; ils n'ont trouvé d'augmentation de l'indican que dans un nombre de cas très restreint de tuberculose chez l'enfant. Conséquemment, l'indicanurie ne doit pas constituer un signe important de diagnostic.

On comprend du reste que l'on ne puisse observer une augmentation d'indican que dans les cas de vastes foyers tuberculeux ou d'ulcères de l'intestin.

Au surplus, pour faire suite à l'observation générale que nous avons présentée il y a un instant, nous ferons remarquer que si le régime lacté, dans les conditions de la santé, amène le taux urinaire de l'indoxyle à être nul ou du moins très près de zéro, il peut très bien n'en être plus de même lorsque l'intestin est le siège de putréfactions excessives, d'ordre pathologique, sur lesquelles un régime alimentaire n'a plus aucune prise. C'est ainsi que dans certains cas de tuberculose intestinale, il est fréquent d'observer une forte décharge d'indoxyle, alors que les individus sont exclusivement soumis au régime lacté.

De même, s'il est bien vrai que le bacille d'EBERTH ne forme pas

(294) CATTANEO. *Policlinico*, 15 mars 1897.

(295, 296) HOCHSINGER. Ueber Indikanurie im Säuglingalter. *Wien Medic. Presse*, 31, 1570, 1890, et 31, 1617, 1890.

(297) MOMIDŁOWSKI. Ueber das Verhalten des Indikans bei Kindern. *Jahrb. für Kinderheilkunde*, 32, 192, 1902.

(298) STEFFEN. Beiträge zur Indikanausscheidung bei Kindern. *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 34, 18, 1904.

d'indol dans les bouillons, on voit souvent apparaître une abondante excrétion d'indoxyle dans l'urine au cours de la fièvre typhoïde. C'est qu'au bacille spécifique peuvent s'associer d'autres microbes capables de produire de vives fermentations, c'est qu'aussi beaucoup d'affections paratyphoïdes sont dues à des coli éberthiformes capables de donner de l'indol pour leur propre compte.

Signification de l'indoxyle urinaire.

Ce serait sortir du cadre de notre travail, si nous devions nous étendre sur la signification qu'il y a lieu d'accorder à l'indoxyle urinaire, au point de vue séméiologique en médecine.

Quand nous aurons dit que l'indicanurie est constante chez l'homme et les animaux domestiques, que le taux de l'indoxyle urinaire oscille beaucoup du jour au lendemain chez un même individu en bon état de santé, que ses variations d'ordre alimentaire sont de même grandeur que celles que l'on pourrait faire dépendre d'un état pathologique, nous aurons montré qu'il est difficile de rapporter, comme beaucoup ont voulu le faire, à des troubles dans le fonctionnement d'un organe (foie, estomac, rein, etc...) les différences constatées dans le quantum de cet indoxyle.

La plupart des auteurs s'accordent d'ailleurs à dire aujourd'hui que la valeur séméiologique de l'indoxylurie est pour ainsi dire nulle.

Pour eux, seulement l'hyperindoxylurie doit avoir une importance clinique. Malheureusement, il est difficile, pour ne pas dire impossible d'assigner une limite à partir de laquelle l'indoxylurie devient hyperindoxylurie.

Une des manifestations les plus marquées de l'hyperindoxylurie est sans conteste le phénomène de l'indigurie.

Or, l'indigurie a parfois été observée chez l'homme bien portant, et il n'est pas rare de la constater chez les herbivores domestiques non malades dont l'intestin est régulièrement le siège d'une forte production d'indol.

D'ailleurs, dans le cas particulier de l'indigurie, il est aussi des plus intéressants de porter son attention sur l'acide glyconique conjugué à l'indoxyle.

Ce n'est pas ici le moment de rechercher l'origine de ce dernier acide. Nous voulons simplement attirer l'attention sur ce fait fort remarquable que l'acide glycuronique apparaît quand toute la réserve de soufre convenable, nécessaire à la sulfoconjugaison, a été épuisée. Comme les phénols, l'indoxyle ne s'élimine jamais en nature, nous l'avons déjà dit, mais bien sous forme d'éthers. Si leur production s'exagère, on conçoit qu'il doit arriver un moment où il n'y aura plus de soufre convenable pour satisfaire à leur éthérification sulfurique; c'est alors que l'acide glycuronique se montre jouant en cela un rôle de défense, puisque par son union aux phénols et à l'indoxyle il diminuera et sinon détruira la nocuité de ces produits, la plupart toxiques.

L'acide glycuronique n'a été trouvé par MAYER et NEUBERG (153) qu'en très petite quantité dans l'urine normale.

Chez un chien soumis au régime de la soupe au pain, nous avons constaté que les urines n'en contiennent également que des traces. En ce qui concerne le soufre, on n'y trouve que des sulfates libres et fort peu de sulfoconjugués.

Administrons maintenant de l'indol : la quantité de sulfoconjugués augmente pendant que les sulfates libres diminuent. Enfin, si la quantité d'indol ingérée est forte, il n'y a plus de sulfates libres dans l'urine.

Tout le soufre disponible se trouve dans l'acide indoxylsulfurique, et comme il n'y en a pas encore assez pour satisfaire à l'éthérification de tout l'indoxyle, ce qui, de ce dernier n'aura pu s'unir à l'acide sulfurique, se conjuguera à l'acide glycuronique qui apparaît alors à ce moment.

L'éthérification glycuronique est donc un processus physiologique de suppléance. Ce sont les circonstances qui la font naître; ces circonstances sont de deux ordres :

1^o Une augmentation des phénols et de l'indol fabriqués dans l'intestin;

2^o L'insuffisance de l'éthérification sulfurique.

L'acide glycuronique n'est donc déversé dans l'urine que lorsqu'il devient nécessaire : c'est là un fait expérimental des mieux marqués que nous ne saurions pouvoir expliquer actuellement.

CONCLUSIONS

En résumé, dans ce travail, nous avons montré :

1° Le chlorure mercurique précipite l'indol et peut être utilisé pour séparer ce dernier composé de son homologue, le scatol;

2° L'indol et ses homologues ne sont pas toxiques, même à des doses élevées et pour des animaux différents;

3° L'indoxyle libre, l'acide indoxylcarbonique, n'ont également pas une toxicité bien marquée;

4° Le foie est l'organe principal qui manipule l'indol pour le transformer en chromogènes indoxyliques;

5° La méthode aux oxydants qui permet d'obtenir des couleurs indigotiques en partant des chromogènes indoxyliques, donne toujours un mélange d'indigotine et d'indirubine, quelles que soient les conditions dans lesquelles on opère;

6° La méthode aux indogénides, par son procédé à l'isatine chlorhydrique, est la méthode de choix pour la recherche des chromogènes indoxyliques dans les liquides physiologiques, quels qu'ils soient;

7° La colorimétrie appliquée à l'indirubine obtenue par le procédé à l'isatine chlorhydrique, est susceptible d'être employée pour le dosage de l'indoxyle urinaire.;

8° Le chromogène indigurique qui se décompose, lors de la putréfaction des urines, pour donner naissance d'abord à de l'in-

doxyle, ensuite à de l'indigo bleu ou rouge, est un dérivé glycuronique de l'indoxyle ;

9° La combinaison de l'acide glycuronique et de la parabromophénylhydrazine peut être considérée comme une lactazame ;

10° L'indigurie peut être réalisée expérimentalement en administrant à un animal de fortes doses d'indol, d'indoxyle et d'acide indoxylcarbonique ;

11° L'indol physiologique n'a qu'une seule origine, l'attaque de matériaux protéiques convenables par des bactéries, hôtes du tube intestinal ;

12° Il est possible de rendre nulle l'élimination indoxylque en soumettant les animaux au régime lacté ou au régime très hydrocarboné de la soupe au pain.

Vu et approuvé :

Paris, le 3 juin 1908.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

PAUL APPELL.

Permis d'imprimer :

Paris, le 3 juin 1908.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

L. LIARD.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Colorimétrie et spectrocolorimétrie.

Vu et approuvé :

Paris, le 30 mai 1908.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

PAUL APPELL.

Permis d'imprimer :

Paris, le 30 Mai 1908.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

L. LIARD.

